

Molekulargenetische Studien zu verschiedenen Kandidatengenen für frühmanifeste (extreme) Adipositas

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Biologie und Geographie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Timo Dirk Müller

aus Herborn
September 2008

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im molekulargenetischen Forschungslabor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters, Rheinische Kliniken Essen, Klinikum der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. J. Hebebrand
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. H. Esche
3. Gutachter: Herr PD Dr. G. Hilken

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2009

1. Einleitung	13
1.1 Adipositas	13
1.1.1 Definition und Klassifikation	13
1.1.2 Diagnostik	15
1.1.3 Folge- und Begleiterkrankungen	16
1.1.4 Prävalenz bei Kindern und Jugendlichen	16
1.2 Ätiologie der Adipositas	17
1.2.1 Allgemeine Ursachen der Adipositas	17
1.2.2 Die Hypothese des sparsamen Genotyps	17
1.2.3 Formalgenetische Befunde	18
1.3 Molekulare Mechanismen der Gewichtsregulation	19
1.3.1 Zentrale Areale mit Beteiligung an der Gewichtsregulation.....	19
1.3.2 Zentrale und periphere Regelkreise der Nahrungsaufnahme	19
1.4 Molekulargenetische Befunde.....	24
1.4.1 Tierexperimentelle Befunde	24
1.4.2 Befunde beim Menschen	27
1.5 Genetisch-statistische Analysen	29
1.5.1 Kopplung	29
1.5.2 Assoziation.....	31
1.6 In der vorliegenden Arbeit analysierte Kandidatengene.....	34
1.6.1 Gene des Endocannabinoidsystems, <i>CNR1</i> , <i>MGLL</i> sowie <i>NAAA</i>	34
1.6.2 Das <i>FTO</i> ('fat mass and obesity associated') Gen	40
2. Ziel der Studie.....	44
3. Material und Methoden	46
3.1 Das Studienkollektiv	46
3.1.1 Rekrutierung der Probanden.....	46
3.1.2 Das Adipositas-Interventionsprogramm 'Obeldicks'	47
3.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien.....	47
3.1.4 Deskriptive Statistik der Studienteilnehmer.....	48
3.2 Auswahl der untersuchten SNPs	48

3.3	Verwendete Chemikalien	51
3.4	Isolation der DNA-Proben	52
3.4.1	Isolation der DNA aus Vollblut.....	52
3.4.2	Isolation der DNA aus Speichel.....	53
3.5	Konzentrationsbestimmung der DNA (Quantifizierung)	53
3.6	Verdünnung der DNA-Proben.....	54
3.7	<i>In-Vitro</i> Amplifizierung von DNA-Fragmenten	54
3.7.1	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	54
3.7.2	Primerdesign und Qualitätskontrolle	55
3.8	Agarosegelelektrophorese	56
3.9	Methoden zur Genotypisierung und Mutationsverifizierung	57
3.9.1	PCR-Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (PCR-RFLP)....	57
3.9.2	Allelspezifische Polymerase-Ketten-Reaktion (ARMS-PCR)	59
3.9.3	MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	60
3.10	Methoden zur Identifikation unbekannter Mutationen	62
3.10.1	Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCP)	62
3.10.2	Mutationssuche mittels dHPLC	65
3.11	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	68
3.12	Statistik	69
3.12.2	Wahl des Signifikanzniveaus.....	70
3.12.3	Chi-Quadrat (χ^2)Test	70
3.12.4	Fisher's exakt Test.....	71
3.12.5	Bonferroni Korrektur für multiples Testen.....	72
3.12.6	Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT)	72
3.12.7	Pedigree-Disequilibrium-Test (PDT)	72
3.12.8	Cochran-Armitage-Test für einen Trend und Odds Ratio	73
3.12.9	Berechnung des Kopplungsungleichgewichts (LD)	73
4.	Ergebnisse	74
4.1	Gene des Endocannabinoidsystems; <i>CNR1</i>, <i>NAAA</i> und <i>MGLL</i>	74
4.1.1	Ergebnis der familienbasierten Assoziationsstudien	74

4.1.2	Mutationsscreen in der kodierenden Region vom <i>CNR1</i>	80
4.2	Das <i>FTO</i> ('fat mass and obesity associated') Gen	85
4.2.1	Assoziation von rs9939609 mit frühmanifester (extremer) Adipositas	85
4.2.2	Assoziation des rs9939609 Genotyps mit der Gewichtsreduktion nach einer einjährigen Adipositas-Interventionstherapie	87
4.2.3	Assoziation des rs9939609 Genotyps mit Parametern des Glukose- und Fettstoffwechsels	88
5.	Diskussion	89
5.1	Analysierte Gene des Endocannabinoidsystems; <i>CNR1</i>, <i>NAAA</i> und <i>MGLL</i>.....	89
5.1.1	Assoziationsstudien in dem <i>CNR1</i> , in der <i>NAAA</i> sowie in der <i>MGLL</i>	89
5.1.2	Mutationsscreen in der kodierenden Region vom <i>CNR1</i>	92
5.2	Das <i>FTO</i> ('fat mass and obesity associated') Gen	96
5.2.1	Assoziation von rs9939609 mit frühmanifester (extremer) Adipositas	96
5.2.2	Assoziation des rs9939609 Genotyps mit der Gewichtsreduktion nach einer einjährigen Adipositas-Interventionstherapie	96
5.2.3	Assoziation des rs9939609 Genotyps mit Parametern des Glukose- und Fettstoffwechsels	97
6.	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	99
7.	Referenzen	102
8.	Anhang	118
8.1	Sequenz des gescreenten Bereichs vom <i>CNR1</i>	118
8.2	Eigene Publikationen	118
9.	Danksagung	121
10.	Lebenslauf.....	122
11.	Eidesstattliche Erklärung.....	123

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Regulation der Nahrungsaufnahme im Hypothalamus.	23
Abbildung 2: Biosynthese und Degradation der Endocannabinoide.	36
Abbildung 3: Signaltransduktion des CNR1.....	37
Abbildung 4: Ergebnis der Genotypisierung von 440.794 SNPs (Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 5.0) an 487 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 442 untergewichtigen Kontrollen ...	42
Abbildung 5: Position der im <i>CNR1</i> untersuchten SNPs.	49
Abbildung 6: Position der in der <i>NAAA</i> untersuchten SNPs	49
Abbildung 7: Position der in der <i>MGLL</i> untersuchten SNPs	49
Abbildung 8: Allelspezifische Primerextensionsreaktion mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	62
Abbildung 9: Bildung von Homo- und Heteroduplices bei der dHPLC.	65
Abbildung 10: dHPLC Darstellung eines Absorptions-Zeit-Chromatogramms.....	67
Abbildung 11: LD-Struktur der untersuchten SNPs im <i>CNR1</i> , in der <i>NAAA</i> sowie der <i>MGLL</i> basierend auf den in durch die Genotypisierung erhaltenen Genotypfrequenzen.	80
Abbildung 12: SSCP-Gel für <i>CNR1</i> Fragment 5 mit auffälligem Bandenmuster an Position 3.....	82
Abbildung 13: Ergebnis der Sequenzierung der mittels SSCP im <i>CNR1</i> detektierten Varianten.	83
Abbildung 14: Schematische Struktur des CNR1 Proteins.	95
Abbildung 15: Sequenz des gescreenten Bereichs vom <i>CNR1</i>	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation von Normalgewicht sowie Adipositas anhand des BMI nach Empfehlung der WHO 2000.....	13
Tabelle 2: BMI-Perzentilen für deutsche Kinder und Jugendliche nach Empfehlung der Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA)	14
Tabelle 3: Zusammensetzung des Studienkollektivs	48
Tabelle 4: In dieser Arbeit analysierte SNPs	50
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien	51
Tabelle 6: Für die DNA-Isolation verwendeten Lösungen	52
Tabelle 7: PCR-Mastermix	55
Tabelle 8: PCR-Zyklen	55
Tabelle 9: PCR-Primer für die <i>CNR1</i> Analysen	56
Tabelle 10: TAE und TBE-Puffer	57
Tabelle 11: Auftragspuffer	57
Tabelle 12: Verwendete Restriktionsenzyme für Analysen im <i>CNR1</i>	58
Tabelle 13: Sequenzen der verwendeten ARMS-Primer	59
Tabelle 14: Reaktionsansatz für die ARMS-PCR	60
Tabelle 15: Mittels MALDI-TOF analysierte SNPs.....	61
Tabelle 16: Für die SSCP verwendeten Lösungen.....	64
Tabelle 17: Ladungspuffer für die SSCP	65
Tabelle 18: Säulenbedingungen und verwendete Puffer für die Mutationssuche mittels dHPLC.....	68
Tabelle 19: Vier-Felder-Tafel für die Berechnung des χ^2 -Wertes.....	71
Tabelle 20: Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT).....	72
Tabelle 21: Genotyp- und Allelfrequenzen der untersuchten SNPs in dem <i>CNR1</i> , in der <i>NAAA</i> sowie in der <i>MGLL</i> sowie Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in den Indexpatienten der Adipositaestrios.....	75
Tabelle 22: Genotyp- und Allelfrequenzen der untersuchten SNPs in dem <i>CNR1</i> , in der <i>NAAA</i> sowie in der <i>MGLL</i> sowie Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in den Eltern der Adipositaestrios.....	76
Tabelle 23: Ergebnisse des TDT für die untersuchten SNPs im <i>CNR1</i> , in der <i>NAAA</i> sowie der <i>MGLL</i> in den Adipositaestrios	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 24: Genotyp und Allelfrequenz des <i>CNR1</i> SNP rs1049353 sowie des NAAA SNP rs6819442 in 235 Adipositasquartetten	78
Tabelle 25: Zusammenfassende Analyse des <i>CNR1</i> SNP rs1049353 sowie des NAAA SNP rs6819442 in 368 Adipositasstrios und 235 Adipositasquartetten	79
Tabelle 26: Analyse des TGC-Haplotyp im <i>CNR1</i>	79
Tabelle 27: Ergebnisse des Mutationsscreens mittels SSCP und dHPLC.....	81
Tabelle 28: Deskriptive Statistik der Familien, welche die neu identifizierte c.1256C/A bzw. die 1419+1G/C Variante im <i>CNR1</i> tragen.....	84
Tabelle 29: Genotyp- und Allelfrequenzen des <i>FTO</i> SNP rs9939609 bei 519 deutschen adipösen Kinder und Jugendlichen (Fälle) sowie 178 erwachsenen, normalgewichtigen Kontrollen.....	85
Tabelle 30: Ergebnis der Assoziationsstudie des <i>FTO</i> SNP rs9939609 mit Adipositas bei 519 deutschen adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 178 erwachsenen, normalgewichtigen Kontrollen.....	86
Tabelle 31: Ergebnis der Assoziationsstudie des <i>FTO</i> SNP rs9939609 mit Adipositas bei 519 deutschen adipösen Kinder und Jugendlichen sowie 620 erwachsenen normal- und untergewichtigen Kontrollen	87
Tabelle 32: Genotypverteilung des <i>FTO</i> SNP rs9939609 sowie Δ BMI-SDS von den 207 adipösen Kindern und Jugendlichen, die an der einjährigen Adipositas-Interventionstherapie teilnahmen	88
Tabelle 33: Assoziation des <i>FTO</i> rs9939609 Genotypstatus mit Blutparametern des Glukose- und Fettstoffwechsels	88

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AC	Adenylat Zyklase
AGA	Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter
AgRP	Agouti related Protein (engl. Agouti regulated Protein)
AN	Anorexia nervosa
APS	Ammoniumpersulfat
ARC	Nukleus Arcuatus
ARMS-PCR	allelspezifische Polymerase-Kettenreaktion
AS	Aminosäure
ASP	Erkrankte-Geschwisterpaar-Analyse (engl. Affected Sibpair Analyses)
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BMI	Body Mass Index (kg/m ²)
BMI-SDS	BMI Standard Deviation Score
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat
CART	Kokain- und Amphetamin-reguliertes Transkript
CCK	Cholescystokinin
CCK1R	Cholescystokinirezeptor 1
CI	Konfidenzintervall
cM	Zentimorgan
CNR1	Cannabinoidrezeptor 1
CNR2	Cannabinoidrezeptor 2
CO ₂	Kohlendioxid
CRH	Kortikotropin-freisetzendes
DAGL	Diazylglyzerollipase
db/db	leptinrezeptordefiziente Maus (db von engl. diabetes)
ddNTP	Didesoxyribonucleosidtriphosphat
DEXA	Dual Energy X-Ray Absorptiometrie
dHPLC	denaturing High Performance Liquid Chromatography
DIO	diätinduzierte Adipositas (von engl. diet induced obesity)
dl	Deziliter
DMN	dorsomedianer Nukleus
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
ECS	Endocannabinoidsystem
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Abkürzungsverzeichnis

EMT	Endocannabinoidmembrantransporter
ESE	Exon Splice Enhancer
FAAH	Fettsäure Amid Hydrolase
Fe(II)	Eisen-II-Ionen
FTO	‘fat mass and obesity associated’ Gen
G	Guanin
g	Gramm
Ghr	growth hormone segretagouge receptor
GLP1	Glucagon like peptide 1
GTS	Gilles de la Tourette Syndrom
GWA	genomweite Assoziationsstudie
HCL	Salzsäure
HDL	high density lipoprotein cholesterol
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
IBD	identical by descent
IBS	identical by state
IGF1	insulin like growth factor 1
K ⁺	Kalium
kb	Kilobasen
kcal	Kilokalorien
kDa	KiloDalton
kg	Kilogramm
KO	Knock-out
LD	Kopplungsungleichgewicht (von engl. linkage disequilibrium)
LDL	low density lipoprotein cholesterol
LHA	laterales hypothalamisches Gebiet
LOD Score	logarithm of the odds score
M	Mol
MAF	Frequenz des selteneren Allels (engl. minor allele frequency)
MAGL	Monoazyglyzerol Lipase
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
Mb	Megabasen
MC1R	Melanokortin 1 Rezeptor
MC3R	Melanokortin 3 Rezeptor
MC4R	Melanokortin 4 Rezeptor
MCH	Melanozyten konzentrierendes Hormon

Abkürzungsverzeichnis

mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGLL	Monoglyzeridlipase (Synonym für MAGL)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmHG	Millimeter-Quecksilbersäule
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon
NAAA	N-Azylethanolamin-hydrolysierende Acid Amidase
NaCl	Natriumchlorid
NAPE-PLD	N-Azylphosphatidyl-Ethanolamin-spezifische Phospholipase D
NAT	N-Azyltransferase
ng	Nannogramm
nm	Nannometer
NMB	Neuromedin B
NPY	Neuropeptid Y
NTS	Nukleus Traktus Solitarius
NZO	‘New Zealand Obese’ Maus
ob/ob	leptindefiziente Maus (ob von engl. obese = adipös)
Ob-Rb	Leptinrezeptor b
OD	optische Dichte
OR	odds ratio
PAA-Gel	Polyacrylamidgel
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PDT	Pedigree-Disequilibrium-Test
PFA	perifornikale Region
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
pmol	Pikomol
POMC	Proopiomelanokortin
PVN	paraventricularer Nukleus
PYY	Peptid YY
QTL	quantitative trait loci
RF	Rekombinationsfrequenz
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RT	Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

SDS	Natriumlaurylsulfat
sek	Sekunde(n)
SNP	single nucleotide polymorphism
Srebp-1c	single response element binding protein 1c
SSCP	single stranded conformation polymorphism analyses
sog.	sogenannt
std	Stunde(n)
T	Thymin
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TDT	Transmissions-Disequilibrium-Test
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	Tetramethylethylendiamid
THC	Tetrahydrocannabinol
TRH	Thyreotropin-freisetzendes-Hormon
U	Einheit (engl. Unit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
VMH	ventromedianer Hypothalamus
VTA	Ventral Tegmental Area
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organisation)
WHR	Verhältnis zwischen Bauch- und Hüftumfang (engl. waist to hip ratio)
WT	Wildtyp
X ²	Chi-quadrat
Y1R	Neuropeptid Y Rezeptor 1
Y5R	Neuropeptid Y Rezeptor 5
ZNS	zentrales Nervensystem
α-MSH	alpha-Melanozyten stimulierendes Hormon
β-MSH	beta-Melanozyten stimulierendes Hormon
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
2-AG	2-Arachidonoylglycerol
2-OG	2-Oxoglutarat

1. Einleitung

1.1 Adipositas

1.1.1 Definition und Klassifikation

Als Adipositas (extremes Übergewicht) bezeichnet man einen über ein bestimmtes Maß hinaus erhöhten Anteil der Körperfettmasse an der Gesamtkörpermasse als Folge einer positiven Energiebilanz (Hebebrand et al. 2001a). Zur Klassifikation der Adipositas hat sich international sowohl bei Kindern- und Jugendlichen als auch bei Erwachsenen die Verwendung des sog. Body-Mass-Index (BMI), der ein körperhöhenbereinigtes Maß für das Körpergewicht darstellt, als adäquates und leicht reproduzierbares Maß für die Körperfettmasse etabliert (Dietz und Robinson 1998). Während der BMI eng mit der Körperfettmasse korreliert (Dietz und Robinson 1998, Mei et al. 2002) besteht gleichzeitig nur eine geringe Korrelation mit der Körperhöhe (Rolland-Cachera et al. 1982). Errechnet wird der BMI aus dem Körpergewicht in Kilogramm (kg) dividiert durch die Körperhöhe in Metern (m) zum Quadrat [1].

$$\text{BMI} = \text{Körpergewicht (kg)} / \text{Körperhöhe (m}^2\text{)}$$

[1]

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO 2000) gelten Personen ab einem BMI von 25,0 kg/m² als übergewichtig. Zudem bezeichnet Personen mit einem BMI von 25,0 – 29,9 kg/m² als präadipös während man bei einem BMI ab 30 kg/m² von Adipositas spricht (bei einem BMI ab 40 kg/m² von extremer Adipositas).

Tabelle 1: Klassifikation von Normalgewicht sowie Adipositas anhand des BMI nach Empfehlung der WHO 2000

Kategorie	BMI (kg/m ²)	
Normalgewicht	18,5 – 24,9	
Präadipositas	25 – 29,9	Übergewicht
Adipositas Grad I	30 – 34,9	
Adipositas Grad II	35 – 39,9	
Adipositas Grad III	> 40	

Die Klassifikation der Adipositas anhand des BMI hat jedoch auch Nachteile. So kann etwa die fehlende Berücksichtigung der Körperzusammensetzung aus Fett- und

Muskelgewebe gerade bei Leistungssportlern (wie etwa Gewichthebern) zu methodisch bedingten Fehleinschätzungen führen. Andererseits ist die altersunabhängige Einteilung der Gewichtsklassen besonders bei Heranwachsenden nicht sinnvoll, da die Körperzusammensetzung entwicklungsabhängigen Schwankungen unterliegt; typischerweise steigt der BMI aufgrund steigender Fettmasse während der ersten sechs Lebensmonate kontinuierlich an, sinkt dann aufgrund eines gesteigerten Längenwachstums bis zu einem Alter von 6 – 8 Jahren ab, um dann erneut wieder kontinuierlich zu steigen (Rolland-Cachera et al. 1991). Neben dem Alter spielt auch das Geschlecht eine wichtige Rolle, wobei Männer in der Regel einen höheren Anteil von Muskelmasse an der Gesamtkörpermasse haben als Frauen.

Um bei Kindern- und Jugendlichen populationsbezogen alters- und geschlechts-spezifische Unterschiede in Relation zum BMI zu berücksichtigen, wurden für verschiedene Populationen alters- und geschlechtsabhängige BMI-Perzentilkurven ermittelt, welche den BMI in Bezug zur jeweiligen geschlechts- und altersspezifischen Referenzpopulation setzen (Hebebrand 1994; Kromeyer-Hauschild et al. 2001). Im Bezug zur betreffenden Population gibt dabei das jeweilige Perzentil an, wieviel Prozent der gleichaltrigen Kinder gleichen Geschlechts einen niedrigeren bzw. höheren BMI aufweisen. Für deutsche Kinder- und Jugendliche wurden gemäß den Richtlinien der Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA) die 90. bzw. 97. Altersperzentile als Grenzwert für Übergewicht bzw. Adipositas definiert (<http://www.a-g-a.de>, Tab. 2). Die Erhebung der Perzentilen erfolgt in Deutschland häufig in Bezug auf eine von Kromeyer-Hauschild erhobene Metaanalyse (Kromeyer-Hauschild et al. 2001). Da diese jedoch auf dem Zusammenschluss von 17 nationalen Studien aus verschiedenen deutschen Städten und Gemeinden basiert, kann diese nur bedingt als repräsentativ für die gesamte Bundesrepublik Deutschland angesehen werden.

Tabelle 2: BMI-Perzentilen für deutsche Kinder und Jugendliche nach Empfehlung der Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA)

Kategorie	Perzentile
Untergewicht	$\leq 49,9$.
Normalgewicht	50. - 89,9.
Übergewicht	90. - 96,9.
Adipositas	≥ 97 .

Eine weitere Methode zur Quantifizierung der Gewichtsklassen ist der BMI-SDS Wert (BMI-Standard Deviation Score), welcher angibt, um welchen Faktor einer Standardabweichung ein individueller BMI in einer bestimmten Population bei gegebenem Alter und Geschlecht ober- oder unterhalb des BMI-Medianwertes liegt.

1.1.2 Diagnostik

Direkte Methoden zur Bestimmung der Körperfettmasse sind u.a. die Magnetresonanztomographie (MRT), die Computertomographie (CT) sowie die Dual-Energy X-Ray Absorptiometrie (DEXA). Indirekte Methoden sind neben der Bestimmung des BMI u.a. die Unterwasserwägung (Hydrodensitometrie) sowie die Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA).

Aussagen zur Verteilung des Fettgewebes im Körper sind dagegen u.a. durch die Berechnung des Verhältnis zwischen Taillen- und Hüftumfang (engl. *Waist-to-Hip Ratio*, WHR), sowie durch die Messung des Taillenumfangs möglich (McCarthy 2006). Von einer abdominalen (viszeralen) Adipositas spricht man bei einer WHR $\geq 0,85$ (Frauen) bzw. 1,0 (Männer) oder bei einem Taillenumfang > 88 cm (Frauen) bzw. 102 cm (Männer) (Expert Panel of the National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III; NCEP-ATP III, 2001). Nach Angaben des NCEP-ATP-III (2001) erfolgt darüber hinaus die Diagnose des sog. „Metabolischen Syndroms“, wenn neben einer abdominalen Adipositas mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Serumtriglyzeridspiegel > 150 mg/dl
- HDL-Cholesterin < 40 mg/dl (Männer) bzw. 50 mg/dl (Frauen)
- Blutdruck (systolisch/diastolisch) $\geq 135/85$ mmHg
- Nüchternblutzucker > 110 mg/dl (oder Vorliegen eines Typ 2 Diabetes mellitus)

Die Unterscheidung zwischen peripherer und abdominaler Adipositas ist besonders in klinischer Hinsicht relevant, da das viszerale Körperfett sehr stoffwechselaktiv ist und mit verschiedenen metabolischen Komplikationen, wie etwa Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM, Kloting et al. 2007), Bluthochdruck (Nishina et al. 2003), Atherosklerose (Van Gaal et al. 1989) sowie einem erhöhten Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis (Despres 2007) korreliert.

1.1.3 Folge- und Begleiterkrankungen

Nach aktuellen Angaben der WHO zählt Adipositas zu den fünf größten gesundheitlichen Risikofaktoren der modernen Gesellschaft (WHO 2006). Zahlreiche Folgeerkrankungen, wie u.a. Bluthochdruck, T2DM, Herzinfarkt, Schlaganfall, Schlafapnoe, Fettleber, Atherosklerose, Glomerulosklerose, Dyslipidämie sowie Veränderungen des Skelett- und Bewegungsapparates sind mit Adipositas vergesellschaftet (Ebbeling et al. 2002). Außerdem sind verschiedene Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Hu et al. 2006), Morbus Alzheimer (Whitmer et al. 2007) sowie verschiedene Krebserkrankungen wie etwa Ösophagus-, Kolon-, Leber-, Pankreas- und Nierenkarzinome mit Adipositas assoziiert; das relative Risiko an einer Krebserkrankung zu sterben, ist bei Personen mit einem BMI $\geq 40 \text{ kg/m}^2$ etwa 1,5 mal höher als bei Personen mit einem BMI von $18,5 - 24,9 \text{ kg/m}^2$ (Calle et al. 2003). Adipöse Personen haben dabei im Vergleich zu normalgewichtigen Individuen sowohl höhere Todesraten in Folge von Krebserkrankungen (Calle et al. 2003) als auch höhere Inzidenzraten zur Entwicklung von Karzinomen (Calle 2007).

1.1.4 Prävalenz bei Kindern und Jugendlichen

Übergewicht und Adipositas haben sich in den vergangenen Jahrzehnten weltweit sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern- und Jugendlichen epidemisch ausgebreitet und sind zu einem zentralen Gesundheitsproblem geworden. Nach aktuellen Schätzungen der WHO waren bereits 2005 weltweit mehr als 20 Millionen Kinder unter 5 Jahren übergewichtig (WHO 2006).

In den USA werden seit 1960 regelmäßig im Rahmen von nationalen Gesundheits- und Ernährungsuntersuchungen die Prävalenzraten von Übergewicht und Adipositas in für die USA repräsentativen Stichproben verschiedener Altersklassen ermittelt (u.a. Ogden et al. 2004, 2006). Während von 1960 bis 1980 keine signifikanten Veränderungen der Adipositasprävalenz bei Kindern und Jugendlichen im Alter von 6 – 19 Jahren beobachtet wurden, zeigt sich seit 1980 ein deutlicher Anstieg der Adipositasprävalenz (Ogden et al. 2006). Nach aktuellen Angaben lagen im Jahr 2003 – 2004 in den USA 33,6 % der 2 – 19 jährigen oberhalb der 85. und 17,1 % über der 95. alters- und geschlechtsbezogenen BMI-Perzentile (Ogden et al. 2006). Zu beachten ist bei diesen Studien jedoch, dass die Erhebung der BMI-Perzentilen auf Referenzangaben aus dem Jahr 1963 – 1994 beruhen (Ogden et al. 2006) und somit Entwicklungsaspekte wie die generelle Zunahme des durchschnittlichen

Körpergewichts in der Bevölkerung seit 1994 unberücksichtigt bleiben. Ein ähnlicher Trend wird jedoch seit Beginn der 80er Jahre auch aus verschiedenen europäischen Ländern wie u.a. den Niederlanden (Fredriks et al. 2000), Belgien (Hulens et al. 2001), England (Stamatakis et al. 2005), Dänemark (Petersen et al. 2002), Spanien (Moreno et al. 2001) und Deutschland (Kalies et al. 2002) berichtet. Des Weiteren berichten einige Studien, dass die BMI-Zunahme in den oberen BMI-Perzentilbereichen deutlich stärker ausgeprägt ist, als in den unteren und mittleren Bereichen (Kalies et al. 2002, Herpertz-Dahlmann et al. 2003).

In Deutschland wurden im Rahmen eines bundesweiten Kinder- und Jugendgesundheits surveys (KiGGS) von 2003 bis 2006 die BMI-Daten von 14.747 Kindern und Jugendlichen im Alter von 3 – 17 Jahren ermittelt. Die Teilnehmer stammten aus 167 für die Bundesrepublik Deutschland repräsentativen Städten und Gemeinden. Die ermittelten BMI-Werte wurden nach Empfehlung der Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA) in alters- und geschlechtsbezogene BMI-Perzentilen umgerechnet. Insgesamt zeigten 15 % der Kinder- und Jugendlichen im Alter von 3 – 17 Jahren einen BMI über der 90. und 6,3 % einen BMI über der 97. Perzentile (Kurth und Schaffrath-Rosario 2007). Die Wahrscheinlichkeit, dass adipöse Kinder und Jugendliche auch im Erwachsenenalter adipös sein werden, ist dabei hoch und beträgt u.a. in Abhängigkeit vom Alter der Kinder sowie dem BMI der Eltern zwischen 8 und 80 % (Whitaker et al. 1997).

1.2 Ätiologie der Adipositas

1.2.1 Allgemeine Ursachen der Adipositas

Die Verbreitung von Übergewicht und Adipositas hat in den letzten Jahrzehnten weltweit epidemische Ausmaße angenommen. Die Ursachen der ansteigenden Prävalenzraten sind dabei komplex und basieren auf veränderten Ernährungs- und Bewegungsgewohnheiten auf der Grundlage einer bestehenden genetischen Prädisposition zur Adipositas (Hebebrand et al. 2001a).

1.2.2 Die Hypothese des sparsamen Genotyps (engl. 'thrifty genotype hypothesis')

Bereits 1962 stellte Neel die Hypothese auf, dass die weite Verbreitung von zu Adipositas prädisponierenden Erbanlagen darauf zurückzuführen sei, dass über Tausende von Jahren die Lebensumstände des Menschen durch immer wiederkehrende Hungerperioden gekennzeichnet waren, in welchen Individuen, die

besonders effizient Energie aufnehmen und speichern konnten, einen Selektionsvorteil gegenüber über Menschen hatten, die Energie weniger effizient verwerteten. Neel folgerte daraus, dass sich zu Adipositas prädisponierende Erbanlagen in der Evolution leichter durchgesetzt haben als Varianten, die z.B. vor Übergewicht schützen (Neel 1962). Ein wissenschaftlicher Beweis, dass die von Neel postulierte Hypothese zutrifft, konnte jedoch bislang nicht erbracht werden.

1.2.3 Formalgenetische Befunde

Die Abschätzung der Erblichkeit (Heritabilität) erfolgt in humanen Studien anhand von Zwillings-, Adoptions- und Familienuntersuchungen unter Heranziehung von BMI-Intrapaarkorrelationen.

Zwillingsstudien

Zwillingsstudien zeigen übereinstimmend eine Heritabilität des BMI von 0,6 – 0,9 (u.a. Stunkard et al. 1986a, 1990, Allison et al. 1996, Pietiläinen et al. 1999, Hebebrand et al. 2001b). Der Anteil von Umwelteinflüssen an der Varianz des BMI beträgt demnach zwischen 10 und 40 %.

Stunkard et al. (1990) untersuchte den BMI von gemeinsam und getrennt aufgewachsenen monozygoten Zwillingspaaren und stellte fest, dass der BMI der gemeinsam aufgewachsenen Zwillinge keine stärkere Korrelation zeigte, als der BMI der getrennt aufgewachsenen Zwillinge. In einer groß angelegten Adoptionsstudie zeigte sich ebenso kein Zusammenhang zwischen dem BMI der Adoptivlinge zum Zeitpunkt der Musterung und dem BMI der Adoptiveltern, wohl aber zwischen dem BMI der Adoptivlinge und dem BMI der leiblichen Eltern (Stunkard et al. 1986b). Gemeinsam gemachte Umwelterfahrungen, wie das Aufwachsen in einer Familie, spielen demnach nur eine unwesentliche Rolle für die Varianz des BMI.

Familienstudien- und Adoptionsstudien

Familien- und Adoptionsstudien deuten generell auf etwas niedrigere Werte für die Erblichkeit des BMI hin (Stunkard et al. 1986b, Maes et al. 1997), wobei die Heritabilitätsschätzungen zwischen von 0,1 (Hartz et al. 1977) und 0,7 (Maes et al. 1997) liegen. Mögliche Ursachen für die z.T. deutlich variierenden Erblichkeitsschätzungen für den BMI sind noch nicht vollständig geklärt. Einerseits liegen den verschiedenen Studien z.T. unterschiedliche Modellberechnungen zu Grunde, andererseits könnten epistatische Effekte die Versuchsergebnisse beeinflussen (Stunkard et al. 1990, Maes et al. 1997).

1.3 Molekulare Mechanismen der Gewichtsregulation

1.3.1 Zentrale Areale mit Beteiligung an der Gewichtsregulation

Dem Gehirn und v.a. dem Hypothalamus kommt bei der Regulation des Energiehaushalts eine besondere Bedeutung zu, indem verschiedene metabolische und neurale Signale aus der Peripherie ihre Informationen an den Hypothalamus weiterleiten und über autonome neuroendokrine Signalstoffe wie Neuropeptide und Peptidhormone die Nahrungsaufnahme steuern (Schwartz et al. 2000). Die Nahrungsaufnahme stimulierende (orexigene) bzw. hemmende (anorexigene) Neuropeptide stehen dabei in komplexen zentralen Regelkreisen miteinander in Wechselwirkung.

Die ersten Hinweise auf eine Beteiligung des Hypothalamus an der Energiehomöostase kamen 1940 von Hetherington und Ranson sowie 1951 von Anand und Brobeck, welche an Laborratten zeigten, dass Läsionen des ventromedianen Hypothalamus (VMH) zu einer Stimulation der Nahrungsaufnahme führen (Hetherington und Ranson 1940), während Läsionen des lateralen Hypothalamus (LHA) eine sofortige Beendigung der Nahrungsaufnahme bewirken (Anand und Brobeck 1951). Weitere an der Regulation des Energiehaushalts beteiligte hypothalamische Areale sind u.a. der Nukleus arcuatus (ARC), der Nukleus paraventricularis (PVN) sowie der dorsomediane Nukleus (DMN) (Schwartz et al. 2000). Des Weiteren sind verschiedene kortikale und subkortikale Areale sowie der Hirnstamm an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt (Morton et al. 2006)

1.3.2 Zentrale und periphere Regelkreise der Nahrungsaufnahme

Eine wichtige Funktion bei der Regulation der Nahrungsaufnahme hat das leptinerge-melanokortinerge System des Hypothalamus (Schwartz et al. 2000). Das System besteht aus verschiedenen miteinander verbundenen Neuronen, welche durch die Sekretion von orexigenen bzw. anorexigenen Neuropeptiden die Nahrungsaufnahme sowie den Energieverbrauch beeinflussen.

Die Nahrungsaufnahme hemmende (anorexigene) Neuropeptide

Im ARC befinden sich zahlreiche Neurone, welche das anorexigene Neuropeptid Proopiomelanokortin (POMC) sezernieren, aus welchem durch posttranslationale Spaltung u.a. die alpha- und beta-melanozytenstimulierenden Hormone (α - und β -MSH) entstehen. Die Inhibition der Nahrungsaufnahme erfolgt, indem α -MSH (Schwartz et al. 2000) und β -MSH (Biebermann et al. 2006) an den Melanokortin 4

Rezeptor (MC4R) binden und durch dessen Aktivierung das Sättigungssignal in verschiedene Hirnareale wie z.B. den paraventrikulären Nukleus (PVN) sowie die perifornikale Region (PFA) weiterleiten (Abb. 1). In nachgeschalteten Hirnarealen erfolgt dann die weitere Freisetzung anorexigener Neuropeptide, wie etwa der 'brain-derived neurotrophic factor' (BDNF, Xu et al. 2003), das Kortikotropin freisetzende Hormon (CRH, Lu et al. 2003) sowie das Thyreotropin-freisetzende Hormon (TRH, Harris et al. 2001), wodurch dann über die Aktivierung kataboler Signalwege die Reduktion der Nahrungsaufnahme erfolgt (Schwartz et al. 2000). Ein weiteres anorexigenes Neuropeptid ist das Kokain- und Amphetamin-regulierte Transkript (CART), welches in den Neuronen des ARC mit POMC koexprimiert wird (Schwartz et al. 2000, Abb.1). Die zentrale Applikation von Cart führt bei Ratten (Kristensen et al. 1998) und Mäusen (Asakawa et al. 2001) zu einer starken Inhibition der Nahrungsaufnahme.

Die Nahrungsaufnahme stimulierende (orexigene) Neuropeptide

Neben den anorexigenen POMC/CART Neuronen besteht das melanokortinerge System aus Neuronen, welche durch die Sekretion orexigener Neuropeptide die Nahrungsaufnahme stimulieren. Einer der stärksten Stimulatoren der Nahrungsaufnahme ist das Neuropeptid Y (NPY), welches erstmals von Tatemoto et al. (1982) beschrieben wurde. Die höchste Konzentration von NPY exprimierenden Neuronen wurde im ARC gefunden, von dem zahlreiche nachgeschaltete neurale Verbindungen in verschiedene Bereiche des Hypothalamus, wie u.a. PVN, VMH, LHA und PFA ziehen und über die Rezeptoren Y1R und Y5R ihre Informationen an nachgeschaltete Neurone weiterleiten (Schwartz et al. 2000, Abb.1). In der LHA sowie der PFA stimuliert NPY u.a. die Expression weiterer orexigener Neuropeptide, wie z.B. das Melanozyten-konzentrierende Hormon (MCH) sowie Orexin 1 und 2; über die Aktivierung anaboler Signalwege erfolgt dann die Steigerung der Nahrungsaufnahme sowie die Reduktion des Energieverbrauchs (Schwartz et al. 2000). In den Neuronen des ARC ist NPY kolokalisiert mit dem 'Agouti-related Protein' (AgRP), einem inversen Agonisten der MC-4 Rezeptoren. AgRP stimuliert die Nahrungsaufnahme, indem AgRP an den MC-4 Rezeptor bindet und diesen inaktiviert, wodurch die α -MSH (Schwartz et al. 2000) und β -MSH (Biebermann et al. 2006) induzierte Signalweiterleitung des Sättigungssignals inhibiert wird. Zudem befinden sich MC-3 Rezeptoren auf den POMC/CART Neuronen, an welche das AgRP bindet und somit die Aktivität der POMC/CART Neurone inhibiert (Abb. 1).

Periphere Regulation der Nahrungsaufnahme

Bereits 1953 erhob Kennedy die Hypothese, dass zirkulierende Signale aus der Peripherie Informationen über die Masse der gespeicherten Energiereserven an das Gehirn weiterleiten, wo dann über die Steuerung autonomer Regelkreise die Regulation der Nahrungsaufnahme erfolgt (Kennedy 1953).

Später stellte sich heraus, dass bei der Regulation von Hunger und Sättigung vor allem Informationen aus dem Fettgewebe sowie dem Gastrointestinaltrakt an das Gehirn vermittelt werden, wo über die Ausschüttung orexigener bzw. anorexigener Neurotransmitter verschiedene katabole und anabole Stoffwechselprozesse katalysiert werden, welche die Nahrungsaufnahme beeinflussen (Schwartz et al. 2000). Generell unterscheidet man zwischen lang- und kurzfristigen Mediatoren der Energiehomöostase. Während die langfristigen Mediatoren proportional zur Fettmasse im Blutkreislauf zirkulieren und dem Gehirn Informationen über die Masse der gespeicherten Energiereserven vermitteln, fluktuiert die Konzentration kurzfristiger Mediatoren in direktem Bezug zu den Mahlzeiten.

Langfristige Regulation der Energiehomöostase

Langfristige Mediatoren der Energiehomöostase sind das in den Langerhansschen Inseln der Pankreas gebildete Insulin (Woods et al. 1979, 1998), sowie das in weißen Adipozyten gebildete Leptin (Zhang et al. 1994).

Bereits 1979 beschrieben Woods et al. die anorexigene Wirkung von Insulin und stellten die Hypothese auf, dass Insulin dem Gehirn Informationen über die Masse der gespeicherten Energiereserven vermittelt (Woods et al. 1979). Unterstützt wurde diese Hypothese u.a. durch die Beobachtung, dass der Insulinspiegel im Plasma proportional dem Körperfettgehalt ist (Bagdade et al. 1967, Woods et al. 1998) und dass Insulinrezeptoren in für die Nahrungsaufnahme relevanten hypothalamischen Regionen exprimiert werden (u.a. Woods et al. 1998).

Das 16 kDa große Peptidhormon Leptin (von griechisch: leptos = dünn) ist das Genprodukt des *ob* (von engl. obese = adipös) Gen (Zhang et al. 1994). Leptin wird in weißen Adipozyten gebildet und über die Blutbahn in die Peripherie sezerniert. Der Plasmaleptingehalt korreliert direkt mit dem Körperfettgehalt (je höher der Fettgehalt, desto höher die Leptinspiegel im Plasma) und vermittelt höher geschalteten Zentren Informationen über die Masse der gespeicherten Energiereserven (Considine et al. 1996). Leptinrezeptoren wurden in fünf verschiedenen Splicevarianten in vielen

Gewebe gefunden (Fei et al. 1997). Der Rezeptor mit der größten Relevanz ist der Ob-Rb Rezeptor, der im Gehirn u.a. im Hypothalamus, Hippokampus, Kortex, Zerebellum und Hirnstamm nachgewiesen wurde, wobei die höchste Konzentration im Hypothalamus gemessen wurde (Fei et al. 1997).

Bei hohen Leptin- und Insulinspiegeln erfolgt die Inhibition der Nahrungsaufnahme, indem Leptin und Insulin im Hypothalamus POMC/CART Neurone stimulieren, während gleichzeitig NPY/AgRP Neurone inhibiert werden (Abb. 1). Zudem werden durch Leptin und Insulin katabole Stoffwechselwege aktiviert, welche den Energieverbrauch stimulieren (Schwartz et al. 2000). Bei niedrigen Leptin und Insulinspiegeln erfolgt dagegen die Stimulation der Nahrungsaufnahme durch die Inhibition der POMC/CART Neurone und Aktivierung der NPY/AgRP Neurone.

Kurzfristige Regulation der Nahrungsaufnahme

Kurzfristige Mediatoren von Hunger und Sättigung regulieren die Nahrungsaufnahme in direktem Bezug zu den Mahlzeiten und den damit verbundenen Sinnesreizen. So werden u.a. ausgelöst durch Nahrungsbestandteile, Geschmack sowie olfaktorische und Dehnungsreize der Nahrung von verschiedenen gastrointestinalen Bereichen Peptidhormone sezerniert, welche u.a. über afferente Fasern des Nervus vagus zum Nukleus Traktus Solitarius (NTS) geleitet werden. Vom NTS werden die Signale in verschiedene Hirnareale wie dem parabranchialen Nukleus, Nukleus akkumbens, zerebralen Kortex, Striatum, Ventral Tegmental Area (VTA) sowie den Hypothalamus weitergeleitet, wo über efferente Signalweiterleitung die kurzfristige Modulation der Nahrungsaufnahme erfolgt (Cummings und Overduin 2007).

Zu den die Nahrungsaufnahme inhibierenden gastrointestinalen Hormonen gehört u.a. das Choleszystokin (CCK), dessen anorexigene Wirkung erstmals von Gibbs et al. (1973) beschrieben wurde; die periphere Applikation von CCK direkt vor einer Mahlzeit führte bei Ratten zu einer dosisabhängigen Reduktion der Nahrungsaufnahme (Gibbs et al. 1973). CCK wird in I-Zellen des Duodenums gebildet und u.a. durch Dehnungsreize der Nahrung sezerniert. CCK gelangt über afferente Fasern des Nervus vagus zum NTS, von wo es in verschiedene Gehirnareale wie dem Nachhirn sowie dem Hypothalamus weitergeleitet wird und über die Aktivierung von CCK1 Rezeptoren (CCK1R) zu einer Beendigung der Nahrungsaufnahme sowie zu einer Reduktion der Portionsgröße führt (Cummings und Overduin 2007). Weitere anorexigene gastrointestinale Peptide sind u.a.

Einleitung

Glucagon, Glucagon-like Peptide 1 (GLP1), Enterostation, Gastrin-freisetzendes Protein (GRP) sowie das Peptid YY (PYY) (Cummings und Overduin 2007).

Stimulierend auf die Nahrungsaufnahme wirkt dagegen das im Magen gebildete Hormon Ghrelin, dessen Plasmakonzentration direkt vor einer Mahlzeit ein Optimum zeigt und aufgrund steigender Resorption von Nahrungsbestandteilen während der Nahrungsaufnahme wieder absinkt (Tschöp et al. 2000). Ghrelin gelangt über die Blutbahn zum Hypothalamus und aktiviert dort durch die Bindung an den 'Growth-hormone-secretagogue Rezeptor' (GHSR) NPY/AgRP Neurone während POMC/CART Neurone inhibiert werden (Abb. 1; Schwartz et al. 2000).

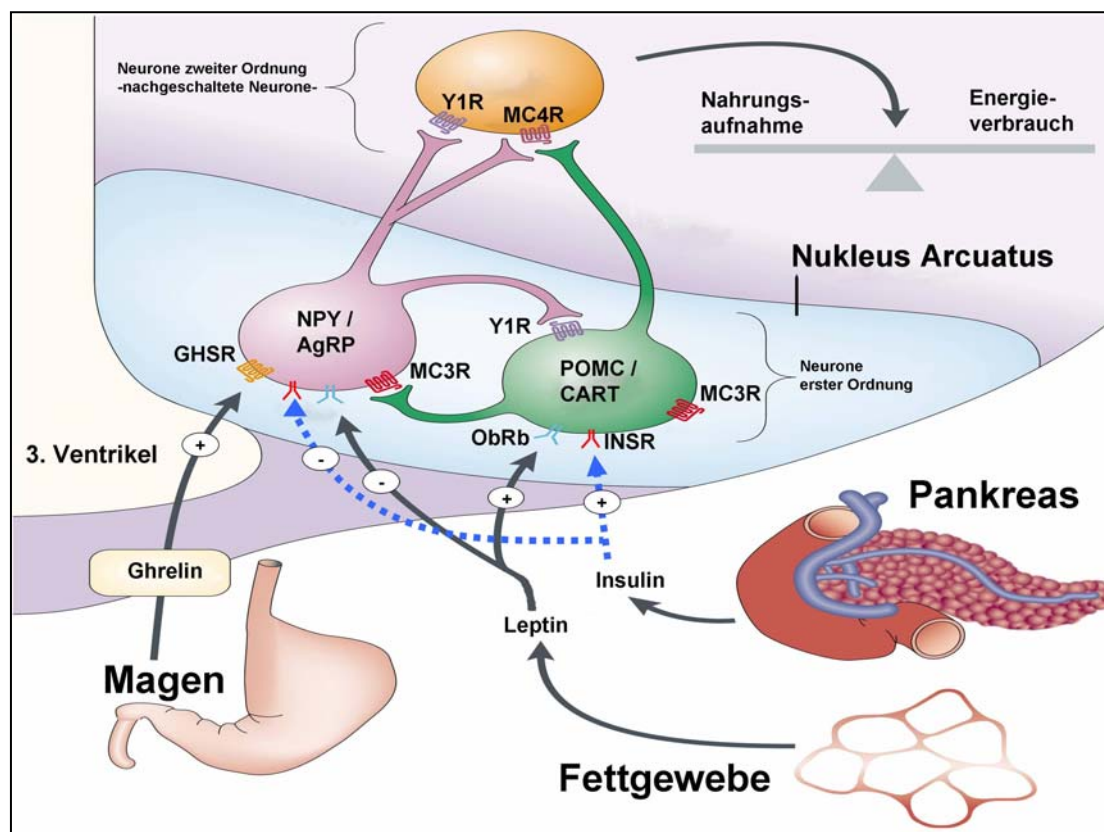


Abbildung 1: Regulation der Nahrungsaufnahme im Hypothalamus. Die Hemmung der Nahrungsaufnahme erfolgt, indem Leptin bzw. Insulin im Nukleus Arcuatus durch Bindung an den Leptinrezeptor (ObRb) bzw. Insulinrezeptor (INSR) POMC/CART Neurone stimulieren, während gleichzeitig NPY/AgRP Neurone inhibiert werden. Über eine Aktivierung des Melanokortin 4 Rezeptors (MC4R) wird das Sättigungssignal dann an nachgeschaltete Hirnareale weitergeleitet. Bei niedrigen Leptin- und Insulinspiegeln erfolgt die Stimulation der Nahrungsaufnahme, indem NPY/AgRP Neurone stimuliert werden, während POMC/CART Neurone inhibiert werden. Für weitere Zeichenerklärung siehe Text. Aus Barsh und Schwartz, *Nat Rev Genet* 2002;3:589-600, verändert.

1.4 Molekulargenetische Befunde

1.4.1 Tierexperimentelle Befunde

Tierexperimente haben bei der Untersuchung molekularer Regelkreise eine besonders große Relevanz, da hier die Möglichkeit besteht, gezielt Kreuzungen durchzuführen oder die Expression von Genen gezielt auszuschalten (*knock-out*) oder zu erhöhen (*knock-in*).

Generell unterscheidet man zwischen mono-, oligo- und polygenen Formen der Adipositas. Während bei den monogenen Formen Mutationen in jeweils einzelnen Genen die Ursache für eine massive Adipositas darstellen, sind bei den oligo- bzw. polygenen Formen Mutationen in mehreren bis vielen Genen die Ursache des adipösen Phänotyps. Monogene Formen der Adipositas sind entweder das Resultat spontan aufgetretener Mutationen, oder aber das Ergebnis des gezielten *knock-out* von Genen. Eine Übersicht über spontane und transgene Formen der Adipositas gibt die 'Obesity Gene Map Database' (<http://obesitygene.pbrc.edu/>).

Spontan aufgetretene monogene Formen der Adipositas im Tiermodell

Bereits 1950 beschrieben Ingalls et al. eine spontan in einem C57BL/6J Mausstamm entstandene '*obese*' (*ob*) Mutante (Ingalls et al. 1950). Eine Mutante mit ähnlichem Phänotyp, die '*diabetes*' (*db*) Maus, wurde von Hummel et al. (1966) beschrieben. Beide Mutationen werden rezessiv vererbt, wobei die homozygoten Mutationsträger eine extreme Adipositas mit einem Körperfettanteil von ca. 50 % des Gesamtgewichts zeigen (Friedman und Halaas 1998). Aus Parabioseexperimenten mit *ob/ob* und *db/db* Mäusen schloss Coleman (1978), dass der *ob/ob* Maus ein zirkulierender Faktor fehlt, der die Energiehomöostase beeinflusst, während die *db/db* Maus den entsprechenden Rezeptor nicht ausbildet (Coleman 1978). Die Hypothese von Coleman wurde 1994 durch die Identifizierung des Peptidhormons Leptin (Zhang et al. 1994) bestätigt; während die *ob/ob* Maus durch einen vollständigen Mangel an Leptin gekennzeichnet ist, ist die *db/db* Maus geprägt durch eine Leptinrezeptordefizienz (Friedman und Halaas 1998). Die Applikation von rekombinantem Leptin führte bei *ob/ob* Mäusen umgehend zu einer Normalisierung des Essverhaltens sowie zu einer nachhaltigen Reduktion des Körpergewichts (Friedman und Halaas 1998).

Neben einer sich langsam entwickelnden Adipositas sind homozygote Mäuse der autosomal rezessiv vererbten *'fatty' (fat)* Mutation geprägt durch eine sich früh entwickelnde Hyperproinsulinämie sowie Hyperglykämie (Naggert et al. 1995). Weiterhin sind homozygote Mäuse nicht insulinresistent, was auf eine fehlerhafte Prozessierung des Insulin aus Proinsulin zurückzuführen ist (Naggert et al. 1995). Der Phänotyp, welcher der *fat/fat* Maus zu Grunde liegt, resultiert aus einer zu einem Funktionsverlust führenden Mutation in dem Carboxypeptidase E Gen (*Cpe*), das für eine Peptidase kodiert, die u.a. an der Prozessierung verschiedener Prohormone wie u.a. Proinsulin und *Pomc* beteiligt ist (Naggert et al. 1995).

Die *'tubby' (tub)* Maus ist neben einer sich spät entwickelnden Adipositas durch Insulinresistenz, Infertilität sowie retinale und cochleare Degenerationen gekennzeichnet (Kapeller et al. 1999). Die positionelle Klonierung des *'tub'* Locus führte zur Identifizierung des Tub Proteins (Kleyn et al. 1996). Obwohl die Funktion von Tub bis jetzt nicht vollständig geklärt ist, konnte in *in-vitro* Studien gezeigt werden, dass Tyrosinreste von Tub als Reaktion auf Insulin und Insulin-like growth factor 1 (IGF1) phosphoryliert werden, was auf eine Beteiligung von Tub in der Signaltransduktion von Insulin hindeutet (Kapeller et al. 1999). Weiterhin zeigen *tub/tub* Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte Expression von *Pomc* im ARC, während die Expression von *Npy* im dorso- und ventromedianen Hypothalamus um das 30-fache erhöht ist (Guan et al. 1998). Des Weiteren zeigen *tub/tub* Mäuse einen niedrigeren Respiratorischen Quotienten (RQ) sowie eine erhöhte Akkumulation von Glykogen in der Leber, was auf eine Beeinträchtigung des Kohlenhydratstoffwechsels hindeutet (Wang et al. 2006).

Das in Haarfollikeln gebildete *Agouti* Protein beeinflusst als Antagonist des α -MSH am Melanokortin 1 Rezeptor (MC1R) die Fellfärbung von Nagern, indem Agouti an den MC1 Rezeptor der Melanozyten bindet, wodurch die Melaninsynthese von der Bildung von Eumelanin (schwarz/braun) zu Pheomelanin (rot/gelb) wechselt (Voisey und Van Daal 2002). Die *'Agouti yellow' (A^y)* Maus trägt eine dominant vererbte Deletion in dem vor dem *Agouti* liegenden *'Raly' (ribonucleoprotein associated with lethal yellow)* Gen, was dazu führt, dass *Agouti* in der *A^y* Maus durch den *Raly* Promoter ubiquitär exprimiert wird und im Hypothalamus als Antagonist am Mc4 Rezeptor wirkt (Voisey und Van Daal 2002). Die *A^y Maus* ist neben einer gelben Fellfarbe durch eine sich spät entwickelnde Adipositas, Hyperinsulinämie sowie eine Insulinresistenz gekennzeichnet (Voisey und Van Daal 2002).

Transgene adipöse Tiermodelle

In der 'Obesity Gene Map Database' sind derzeit mehr als 200 transgene Tiermodelle aufgelistet, die einen mit Gewichtsregulation assoziierten Phänotyp zeigen. Erwartungsgemäß zeigen *Knock-out (KO)* Modelle anorexigener Faktoren, wie etwa *Pomc* (Butler und Cone 2001), *Cart* (Tschöp und Heiman 2001), *Orexin* (Tschöp und Heiman 2001), *Mc4r* (Huszar et al. 1997) sowie *Mc3r* (Butler et al. 2000) eine frühmanifeste extreme Adipositas. Allerdings sind auch *Knock-out* Modelle von Rezeptoren orexigener Neuropeptide (*Npy-y1r*, *-y2r*, *-y5r*) bekannt, welche einen adipösen Phänotyp zeigen (Kushi et al. 1998, Naveilhan et al. 1999). Der *Knock-out* von *Npy* ist jedoch weder mit Adipositas noch mit Untergewicht assoziiert (Erickson et al. 1996). Eine mögliche Erklärung für den adipösen Phänotyp der *Npy* Rezeptor KO Mäuse wäre, dass einige der *Npy* Rezeptoren als Autorezeptoren fungieren und über negative Rückkopplungsmechanismen die Aktivität der *Npy* Neurone inhibieren (Butler und Cone 2001). Ein Ausfall der Rezeptoren könnte dann, wie bei den *Knock-out* Modellen beschrieben, zu einer Hyperphagie und Adipositas führen. Dass der *Knock-out* von *Npy* keine bedeutende Auswirkung auf das Körpergewicht hat, könnte dadurch erklärt werden, dass das Fehlen eines orexigenen Faktors evtl. durch andere orexigene Faktoren kompensiert wird (Qian et al. 2002).

Polygene Tiermodelle

Humane Adipositas ist bis auf wenige Ausnahmen polygenetisch bedingt. Die Analyse polygener Tiermodelle (v.a. Mausmodelle) hat deswegen aus humaner Sicht eine besonders große Relevanz, da aufgrund der genetisch großen Homologie davon auszugehen ist, dass für Adipositas relevante chromosomale Regionen (sog. Quantitative Trait Loci; QTL) der Maus auf homologe Regionen des Menschen hinweisen und umgekehrt. Beispiele für polygene Mausmodelle für Adipositas sind u.a. die *New Zealand Obese (NZO)* Maus (Jürgens et al. 2006) sowie die *Berliner Fettmaus (BFM)*; Wagener et al. 2006).

Nach Angaben der 'Mouse Obesity Gene Map' (<http://193.175.234.87/QTL/overview.php>) sind in polygenen Mausmodellen bislang über 160 für die Gewichtsregulation relevante QTLs identifiziert worden. Die QTLs befinden sich mit Ausnahme des Y-Chromosoms auf jedem Chromosom, wobei sich die größte Dichte auf Chromosom 1, 7 und 11 befindet (Brockmann und Bevova 2002). Jeder dieser QTLs erklärt einen bestimmten prozentualen Anteil der

phänotypischen Varianz des zu Grunde liegenden Phänotyps und gibt Hinweise auf mögliche QTLs in den homologen Regionen des Menschen. In einer Metaanalyse wurden kürzlich die Ergebnisse von 34 genomweiten Kopplungsanalysen für Körpergewicht und Körperfettgehalt bei polygenen Mausmodellen zusammengefasst (Wuschke et al. 2007). Insgesamt zeigten 49 Bereiche einen starken Hinweis auf Kopplung (LOD Score > 4,3) mit dem Körpergewicht bzw. dem Körperfettgehalt. Die stärksten Hinweise auf Kopplung (LOD Score 14,8 – 21,8) zeigten sich auf den Chromosomen 1, 2, 7, 11, 15 und 17, wobei sich in den entsprechenden 58 QTLs mindestens 34 Kandidatengene für Adipositas befinden (Wuschke et al. 2007).

1.4.2 Befunde beim Menschen

Monogene Formen der Adipositas

Bei einigen extrem adipösen Personen wurden zu einem Funktionsverlust führende Mutationen im Gen für Leptin (Montague et al. 1997, Farroqi et al. 2002, Strobel et al. 1998) sowie im Gen für dessen Rezeptor (Clement et al. 1998, Farroqi et al. 2007) gefunden. Da diese Mutationen sehr selten sind und zudem rezessiv vererbt werden, kommen sie nur selten homozygot vor und wurden bislang nur in Mitgliedern blutsverwandter Familien identifiziert. Alle diese Individuen sind u.a. durch eine frühmanifeste extreme Adipositas, Hyperphagie sowie Hyperinsulinämie gekennzeichnet (Farroqi und O`Rahilly 2005). Die Behandlung leptindefizienter Individuen mit rekombinantem Leptin führte umgehend zu einer nachhaltigen Reduktion des Körpergewichts (Farroqi et al. 2002, Licinio et al. 2004).

Bisher wurden sieben Individuen beschrieben, die homozygot sind für Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des *POMC* Gens führen. Durch die fehlende Prozessierung von α - und β -MSH aus *POMC* wird einerseits die Weiterleitung des Sättigungssignals über den MC4-Rezeptor verhindert, andererseits erfolgt keine Bindung von α -MSH an den MC1-Rezeptor der Haarfollikel, weshalb homozygote Mutationsträger neben einer starken Hyperphagie und Adipositas durch eine rötliche Haarfarbe gekennzeichnet sind (Krude et al. 1998, 2003). Kürzlich wurden auch bei einzelnen extrem adipösen Personen zu einem Funktionsverlust führende Mutationen im β -MSH beschrieben (Biebermann et al. 2006). Ähnlich der Mutation, die zu einem Funktionsverlust des *POMC* Gens führt, ist auch das mutierte β -MSH nicht in der Lage, durch Bindung an den MC4R die Nahrungsaufnahme zu reduzieren.

Homozygote Träger von Mutationen, die zum Funktionsverlust der Prohormon Convertase 1 (PC1) führen, zeigen eine frühmanifeste extreme Adipositas, Hyperphagie, Hypokortisolämie, Hypoglykämie, hypogonadotropen Hypogonadismus sowie eine gestörte Prozessierung von Proinsulin und POMC (Jackson et al. 1997, Farroqi und O’Rahilly 2005).

Polygene Formen der Adipositas

In zahlreichen humanen Studien wurden bereits Mutationssuchen im *MC4R* Gen durchgeführt (u.a. Hebebrand et al. 2002, Hinney et al. 1999, 2003, 2006, Wang et al. 2006, Rettenbacher et al. 2007, Ochoa et al. 2007). Dabei zeigte sich, dass ca. 2 – 4 % aller extrem adipösen Individuen dominant vererbte funktionsrelevante *MC4R* Mutationen tragen (Hinney et al. 2003, 2006). Bislang wurden mehr als 90 verschiedene *MC4R* Mutationen beschrieben, wobei die meisten zu einer eingeschränkten bzw. vollständig aufgehobenen Rezeptorfunktion führen (Tao und Segaloff 2005, Hinney et al. 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich *MC4R* Mutationen deutlich stärker im weiblichen als im männlichen Geschlecht auswirken; männliche heterozygote Mutationsträger sind ca. 15 - 20 kg und weibliche 30 kg schwerer als Familienangehörige ohne entsprechende Mutation (Dempfle et al. 2004). Zudem trägt das *MC4R* Gen eine Variante, den Austausch der Aminosäure Valin gegen ein Isoleuzin an der Stelle 103 des Proteins (Val103Ile), die negativ mit Adipositas assoziiert ist (Geller et al. 2004, Heid et al. 2005, Young et al. 2007). Etwa 3 – 5 % der Bevölkerung sind heterozygot für das Ile103 Allel. Im Rahmen einer Metaanalyse an über 7.500 Personen konnte gezeigt werden, dass ein für das Ile103 Allel heterozygoter Mann durchschnittlich 1,5 kg weniger wiegt als ein Homozygoter des Val103 Wildtypallels (Geller et al. 2004). Der Effekt der Val103Ile Variante konnte sowohl an einer Querschnittsstudie an ca. 8.000 Personen aus der Region Augsburg (Heid et al. 2005) als auch kürzlich in einer Metaanalyse an über 29.000 Personen bestätigt werden (Young et al. 2007). Funktionelle Untersuchungen zeigten außerdem, dass die Ile103 Variante zu einer gesteigerten Funktion des MC4R führt (Xiang et al. 2006). Der Val103Ile Polymorphismus ist somit die erste gut validierte polygenetische Variante für Adipositas. Kürzlich wurde zudem eine weitere Variante im *MC4R* Gen (Iso251Leu) identifiziert, welche mit einem erniedrigten Risiko zur Entwicklung einer Adipositas assoziiert ist (Stutzmann et al. 2007). In einer Metaanalyse an insgesamt 11.435 Personen konnte gezeigt werden, dass Träger der

251Leu Variante ein 48 % erniedrigtes Risiko zur Entwicklung einer Adipositas haben als Vergleichspersonen (Stutzmann et al. 2007).

In einer Studie an 694 Personen der „Framingham Heart Study“, wurden kürzlich genomweit etwa 100.000 Polymorphismen genotypisiert (Herbert et al. 2006). Dabei identifizierte man eine mit Adipositas assoziierte Variante in der Nähe des Gens *INSIG2* (Insulin induziertes Gen 2), welches eine zentrale Rolle im Fett- bzw. Cholesterinstoffwechsel spielt (Gong et al. 2006). Homozygote Träger des seltenen Allels (C-Allel) sind im Durchschnitt 3 kg schwerer und haben ein 33 % erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Adipositas als Vergleichspersonen. Obwohl der Befund an insgesamt 9.881 Personen bestätigt wurde (Herbert et al. 2006), konnten andere Studien den Befund nicht bestätigen (Dina et al. 2007a, Loos et al. 2007, Roskopf et al. 2007). In einer weiteren Studie konnte kürzlich jedoch gezeigt werden, dass homozygote Träger des C-Allels durch eine einjährige ernährungs- und bewegungsphysiologische Gewichtsreduktionstherapie weniger Gewicht verlieren, als Personen, die nicht homozygot sind für das Risikoallel (Reinehr et al. 2007). Aufgrund der gegensätzlichen Versuchsergebnisse wird die Frage, ob *INSIG2* ein weiteres Polygen für Adipositas ist, erst durch eine zusammenfassende Metaanalyse (Heid et al., *in Vorbereitung*) beantwortet werden.

1.5 Genetisch-statistische Analysen

1.5.1 Kopplung

Von Kopplung (engl. linkage) spricht man, wenn entweder ein genetischer Marker (bzw. Locus) häufiger als aufgrund freier Rekombination zu erwarten wäre zusammen mit einem bestimmten Phänotyp vererbt wird, oder aber, wenn zwei oder mehr genetische Marker verschiedener Loci innerhalb eines Stammbaums gemeinsam, also nicht unabhängig voneinander, vererbt werden (kosegregieren). Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Loci gekoppelt vererbt werden, ist maßgeblich vom Abstand dieser Loci zueinander abhängig; je kleiner der Abstand zwischen den Loci, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese Loci während der Meiose durch Rekombination getrennt werden und desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese Loci gekoppelt vererbt werden. Werden zwei genetische Marker nicht unabhängig voneinander vererbt, spricht man von einem Kopplungsungleichgewicht (engl. linkage disequilibrium, LD) zwischen den Markern. Im LD liegende Marker werden auch als Haplotyp bezeichnet. Da die Häufigkeit von

Rekombinationsereignissen zwischen zwei Loci in direktem Bezug zu ihrem chromosomalen Abstand steht, wird die Beziehung zwischen der Rekombinationshäufigkeit (RF) und der chromosomalen Entfernung zwischen den Loci durch die relative Einheit Zentimorgan (cM) ausgedrückt. Eine RF von 1 % entspricht ungefähr einem Abstand von 1 cM.

Kopplungsanalysen

Kopplungsanalysen sind hypothesenfreie Verfahren zur Identifizierung krankheitsrelevanter Genorte. Dabei werden eine große Anzahl gleichmäßig über das Genom verteilte Marker, entweder sog. Mikrosatelliten (hochvariable repetitive DNA-Sequenzen) oder aber Einzelbasenaustausche (SNPs von engl. single nucleotide polymorphisms), in einer möglichst großen Anzahl von Familien mit betroffenen sowie nicht betroffenen Familienmitgliedern genotypisiert. Das Ziel ist dabei die Identifizierung von Markern, die mit dem Phänotyp bzw. dem für den Phänotyp verantwortlichen Krankheitsallel kosegregieren.

In konventionellen Kopplungsanalysen werden üblicherweise in einer möglichst großen Anzahl betroffener sowie nicht betroffener Familienmitglieder verschiedener Generationen zwischen 300 und 500 gleichmäßig im Abstand von etwa 10 cM über das Genom verteilte Mikrosatelliten auf Kosegregation mit dem Phänotyp hin untersucht. Das Ergebnis wird durch den sog. LOD Score (engl. logarithm of the odds) ausgedrückt und entspricht dem Logarithmus der Wahrscheinlichkeit, mit welchem der Marker mit dem krankheitsrelevanten Locus gekoppelt ist. Da sich in den ermittelten krankheitsrelevanten Loci zumeist viele Gene befinden, muss die betreffende Region anschließend mit einem dichteren Netz an Markern feinkartiert werden. Da bei der SNP-basierten Kopplungsanalyse der Abstand der SNPs im Genom wesentlich geringer ist als bei Mikrosatelliten, kann bei diesem Ansatz auf eine Feinkartierung weitgehend verzichtet werden.

Generell unterscheidet man zwischen parametrischen und nichtparametrischen Kopplungsanalysen. Während man bei der parametrischen Kopplungsanalyse davon ausgeht, dass der untersuchte Phänotyp nach einem bestimmten vorab definierten Modell vererbt wird, geht man bei der nichtparametrischen Kopplungsanalyse nicht von einem bestimmten Vererbungsmuster aus. Das Prinzip besteht dagegen darin, zu untersuchen, ob betroffene Individuen eines Stammbaums mehr gemeinsame Genvarianten tragen, als aufgrund freier Rekombination zu erwarten wäre. Von

entscheidender Bedeutung ist dabei, ob eindeutig festgestellt werden kann, ob ein bei betroffenen Individuen identifiziertes Allel vom gleichen Vorfahren geerbt wurde (*identical by descent; IBD*) oder aber, ob dies z.B. durch fehlende Elternteile nicht eindeutig festgestellt werden kann (*identical by state; IBS*).

Die ‘Erkrankte-Geschwisterpaar-Analyse’

Die am weitesten verbreitete Variante der nichtparametrischen Kopplungsanalyse ist die Erkrankte-Geschwisterpaar-Analyse (engl. affected sibpair analyses, ASP). Da Geschwister im Durchschnitt 50 % der genetischen Information teilen, geht man bei der ASP davon aus, dass der ähnliche Phänotyp zweier Geschwister auch durch die gleichen Genvarianten bestimmt wird. Bei der ASP sucht man also nach chromosomalen Regionen, in denen sich betroffene Geschwister häufiger ähneln als aufgrund freier Rekombination zu erwarten wäre. Im Rahmen der ASP werden dazu in einer möglichst großen Anzahl betroffener Geschwister und deren Eltern Allele gleicher Herkunft (*IBD*) gesucht, die betroffene Individuen teilen. Kann die Herkunft der Allele, z.B. durch fehlende Elternteile, nicht eindeutig bestimmt werden, können jedoch auch solche Allele (*IBS*) in die Analysen einfließen.

Bisher wurden über 70 genomweite Kopplungsanalysen für mit Adipositas assoziierte Phänotypen durchgeführt (u.a. Perola et al. 2001, Adeyemo et al. 2003, Saar et al. 2003). In einer Metaanalyse, die 37 genomweite Kopplungsanalysen mit dem BMI als quantitativen Phänotyp umfasst, konnten Saunders et al. (2007) die Bereiche 11q13.3 - 11q22.3, 12q23 - 12q24.3, 13q13.2 - 13q33.1, sowie 16q12.2 als BMI-relevante QTLs bestätigen. Weiterhin deuten verschiedene Studien auf die Kopplung eines Bereichs auf Chromosom 10 mit dem BMI hin (Hager et al. 1998; Hinney et al. 2000a).

1.5.2 Assoziation

Während man unter Kopplung die Kosegregation eines oder mehrerer Marker (oder Phänotypen) mit einem krankheitsrelevanten Locus versteht, bezeichnet man entweder das überdurchschnittlich häufige Auftreten eines Allels in einer Gruppe betroffener Personen im Vergleich zu nicht betroffenen Personen (Fall-Kontroll Ansatz) oder aber die überdurchschnittlich häufige Weitergabe eines Allels von den Eltern an die betroffenen Kinder (familienbasierter Ansatz) als Assoziation. Assoziationsstudien können entweder unter der Annahme einer Hypothese in einem für eine bestimmte Erkrankung potentiell relevanten Gen erfolgen

(Kandidatengenstudie) oder aber hypothesenfrei im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien (GWA) durchgeführt werden.

Kandidatengenstudien

Die Auswahl potentiell relevanter Gene bzw. genetischer Varianten (SNPs) erfolgt aufgrund physiologischer, pharmakologischer sowie molekularbiologischer Erkenntnisse (Hinney et al. 2000b).

Der klassische Ansatz zur Untersuchung einer Assoziation ist die sog. Fall-Kontroll Studie. Dabei wird die Häufigkeit einer genetischen Variante in Gruppen betroffener sowie nicht betroffener Individuen verglichen. Ergeben sich bedeutsame Unterschiede in der Häufigkeit der Variante zwischen Fällen und Kontrollen, spricht man von einer Assoziation zwischen der Variante und dem Phänotyp. Für eine ideale Fall-Kontroll Studie dürfen sich aber beide Gruppen nur in dem zu untersuchenden phänotypischen Merkmal unterscheiden. Da die Bildung homogener Subgruppen aber nur schwer möglich ist, kann es bedingt durch Populationsstratifikation zu sog. Scheinassoziationen kommen. Die Replikation initial positiver Assoziationen in unabhängigen Kollektiven ist deswegen eine zwingend erforderliche Voraussetzung zur Vermeidung falsch positiver Befunde (Hinney et al. 2000b).

Zur Umgehung des Problems von Scheinassoziationen aufgrund Stratifikation wurden familienbasierte Assoziationsstudien entwickelt. Der Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT, Spielman et al. 1993) ist dabei ein Test auf Assoziation in Anwesenheit von Kopplung. Beim TDT werden, im Gegensatz zur Fall-Kontroll Studie, sog. Familientrios (betroffener Indexpatient sowie beide biologischen Eltern) für einen bestimmten SNP genotypisiert. Der TDT basiert auf der Grundlage, dass bei Assoziation in Anwesenheit von Kopplung eine genetische Variante von heterozygoten Eltern bevorzugt an die betroffenen Kinder weitergeben wird. Bei einer unabhängig vom untersuchten Phänotyp vererbten Variante erwartet man, dass 50 % der heterozygoten Eltern die Variante an ihre Nachkommen weitergeben (transmittieren). Weicht die Transmissionsrate deutlich von dem Erwartungswert ab, spricht man von einer Assoziation zwischen der Variante und dem Phänotyp.

Genomweite Assoziationsstudien (GWA)

Bei genomweiten Assoziationsstudien (GWA) werden mittels DNA-Mikroarray-Technologie bis zu 1 Millionen über das gesamte Genom verteilte SNPs in entweder einer großen Anzahl von Fällen und Kontrollen (Fall-Kontroll Ansatz) oder aber in

betroffenen Familien (familienbasierter Ansatz) genotypisiert. Bei der Herstellung der Mikroarrays werden kurze Oligonukleotide mit den zu analysierenden SNPs mittels photolithographischer Verfahren auf der Glasoberfläche eines DNA-Mikrochips (Mikroarray) synthetisiert. Die DNA eines Probanden wird nach spezieller Vorbehandlung in den Mikroarray injiziert, wobei die mit einem Farbstoff markierten DNA-Sonden an die komplementären Sequenzen auf der Glasoberfläche des Mikrochips binden und nach der Bindung ein spezifisches Lichtsignal abgeben, welches mit einem speziellen Scanner detektiert und der zu Grunde liegende Genotyp entsprechend analysiert werden kann. Anschließend wird wie in den konventionellen Fall-Kontroll bzw. familienbasierten Ansätzen für jeden SNP untersucht, ob eines der beiden Allele mit dem untersuchten Phänotyp assoziiert ist.

GWA haben sich in kürzester Zeit als ein sehr erfolgreiches Instrument zur Analyse komplexer Erkrankungen herausgestellt (Christensen und Murray 2007). So konnten beispielsweise mehrere für Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) relevante Genvarianten in kurzer Zeit mittels GWA identifiziert werden (Sladek et al. 2007, Scott et al. 2007). Da sich mit der Anzahl der untersuchten Marker aber auch die Irrtumswahrscheinlichkeit für jeden einzelnen Marker erhöht, werden die ermittelten p-Werte üblicherweise mit der Anzahl der durchgeführten Tests (bzw. Marker) multipliziert (Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni; siehe 3.12.5). Da aber das globale Signifikanzniveau unter Beachtung der Korrektur nach Bonferroni bei 1 Millionen untersuchter SNPs bei $\alpha = 5,0 \times 10^{-8}$ liegt (bei 500.000 SNP bei $\alpha = 1,0 \times 10^{-7}$), ist die Korrektur nach Bonferroni bei GWA nur wenig praktikabel. Zur Umgehung dieses Problems verwendeten beispielsweise Herbert et al. (2006) eine familienbasierte zweistufige Teststrategie, wonach zunächst parentale Genotypen dazu verwendet wurden, SNPs zu identifizieren, welche den Phänotyp der Kinder am besten vorhersagen. Der zweite Schritt bestand aus einem familienbasierten Assoziationstest (FBAT), einer Abwandlung des TDT, welcher untersucht, ob die Über- oder Untertransmission eines Allels mit dem untersuchten Phänotyp assoziiert ist (Herbert et al. 2006). Da beide Schritte stochastisch voneinander unabhängig sind, braucht beim zweiten Schritt nur noch für die Anzahl der ausgewählten Marker korrigiert werden.

1.6 In der vorliegenden Arbeit analysierte Kandidatengene

1.6.1 Gene des Endocannabinoidsystems, *CNR1*, *MGLL* sowie *NAAA*

Das Endocannabinoidsystem (ECS)

Der orexigene Effekt von *Cannabis sativa* (Marihuana) ist bereits seit über 2000 Jahren bekannt (Di Marzo et al. 2004, Pagotto et al. 2006). Verantwortlich für diesen Effekt ist das in Marihuana enthaltene Cannabinoid Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC; Berry und Mechoulam 2002). Die intensive Erforschung der dem Δ^9 -THC zu Grunde liegenden Wirkmechanismen führte in den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts zur Identifizierung des Endocannabinoidsystems (ECS), einem System aus endogen gebildeten Cannabinoiden (Endocannabinoiden), den Cannabinoidrezeptoren sowie Enzymen, welche die Synthese, Aktivität und den Abbau der Endocannabinoide steuern (Pagotto et al. 2006). Neben der Regulation der Nahrungsaufnahme ist das ECS an einer Reihe neurophysiologischer Prozesse beteiligt, wie u.a. der Modulation von Schmerz-, Stress- und Immunreaktionen (Di Marzo et al. 2004).

Endocannabinoide

Endocannabinoide sind Derivate langkettiger ungesättigter Fettsäuren, v.a. der Arachidonsäure. Bisher wurden etwa 15 Endocannabinoide beschrieben, die prominentesten sind das 2-Arachidonoylglycerol (2-AG, Sugiura et al. 1995) sowie das N-Arachidonylethanolamid (Anandamid, Devane et al. 1992). Alle diese Endocannabinoide führen nach exogener Applikation zu einer Stimulation der Nahrungsaufnahme (Pagotto et al. 2006). Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften können die Endocannabinoide nicht in sekretorischen Vesikeln gespeichert werden, weshalb die Synthese und Sekretion stets unmittelbar dort und zu dem Zeitpunkt erfolgt, wo sie gerade benötigt werden (Di Marzo et al. 2004).

Enzyme, die den Abbau der Endocannabinoide steuern

Die Inaktivierung der Endocannabinoide erfolgt zeitnah durch spezifische Hydrolasen und Lipasen. Die drei derzeit am besten charakterisierten Enzyme, welche mit hoher Effektivität Endocannabinoide degradieren, sind die Fettsäureamidhydrolase (FAAH), die Monoglyceridlipase (MGLL) sowie die N-Azylethanolamin-hydrolysierende Acid Amidase (NAAA) (Puffenbarger 2005).

FAAH ist ein membrangebundenes 60 - 65 kDa Protein welches sowohl in der Peripherie wie auch im Gehirn weit verbreitet ist (Puffenbarger 2005). Im ZNS ist

FAAH vorwiegend in postsynaptischen Neuronen lokalisiert, wo FAAH unter alkalischen Bedingungen sehr rasch die orexigene Wirkung von Anandamid inhibiert, indem FAAH Anandamid in Ethanolamin und Arachidonsäure hydrolysiert (Di Marzo et al. 2004, Abb. 2). NAAA ist ein Enzym mit ähnlicher Funktion, jedoch zeigt NAAA im Gegensatz zu FAAH ein pH-Optimum bei pH = 4,5 – 5 und hat zudem eine etwas geringere Affinität zu Anandamid als FAAH, weshalb man davon ausgeht, dass NAAA vorwiegend in peripheren Organen wie z.B. dem Magen für die Degradation von Anandamid verantwortlich ist (Puffenbarger 2005).

MGLL ist eine Serinhydrolase, die üblicherweise die Hydrolyse von Monoglyceriden in Fettsäuren und Glycerol katalysiert (Fredrikson et al. 1986). Im Gehirn ist MGLL oftmals mit CNR1 kolokalisiert, besonders in Axonen präsynaptischer Neuronen, wo MGLL mit hoher Effektivität 2-AG hydrolysiert, wobei endogene Anandamidlevel unbeeinflusst bleiben (Puffenbarger 2005).

Die Synthese und Degradation der Endocannabinoide durch FAAH und MGLL ist in Abb. 2 dargestellt. Die Synthese von 2-AG erfolgt in postsynaptischen Neuronen, indem die membrangebundene Phospholipase C (PLC) Glyzerophospholipid in Sn-1-Azyl-2-Arachidonoyl-Glycerol umwandelt, welches dann von der ebenfalls membrangebundenen Diazylglycerollipase (DAGL) in 2-AG hydrolysiert wird (Di Marzo et al. 2004). 2-AG gelangt über Endocannabinoidmembrantransporter (EMT) in den synaptischen Spalt, wo 2-AG als Agonist am Cannabinoidrezeptor 1 (CNR1) wirksam wird. Zudem wird 2-AG durch die EMT in das präsynaptische Neuron geschleust, wo dann die Monoglyceridlipase (MGLL) 2-AG in Glycerol und Arachidonsäure hydrolysiert. Die Anandamidsynthese erfolgt dagegen, indem Glyzerophospholipid zusammen mit Phosphatidylethanolamin durch die an intrazelluläre Membranen gebundene N-Azyltransferase (NAT) in N-Arachidonoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin (NArPE) umgewandelt wird, welches dann von der ebenfalls an intrazelluläre Membranen gebundenen N-Azylphosphatidyl-Ethanolamin-spezifischen Phospholipase D (NAPE-PLD) in Anandamid umgewandelt wird. Anandamid gelangt dann über die EMT in den synaptischen Spalt, wo es als Agonist am CNR1 wirksam wird. Zudem wird Anandamid über die EMT wieder zurück in das postsynaptische Neuron geschleust, wo FAAH Anandamid zu Ethanolamin und Arachidonsäure hydrolysiert (Di Marzo et al. 2004, Abb. 2).

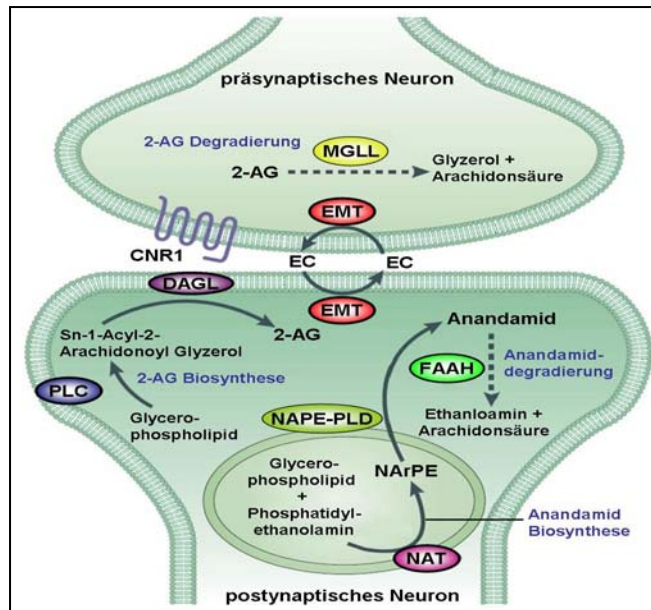


Abbildung 2: Biosynthese und Degradation der Endocannabinoide. Zeichenerklärung siehe Text. Aus Di Marzo et al. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:771-784, verändert.

Cannabinoidrezeptoren (CNR1 und CNR2)

Bisher wurden zwei Cannabinoidrezeptoren beschrieben, CNR1 (Devane et al. 1988) und CNR2 (Munro et al. 1993). Beide sind aus sieben Transmembrandomänen bestehende G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die u.a. über die Regulation der Adenylat Zykase sowie der Proteinkinasen A und C die Aktivität von spannungsgesteuerten Kalium- (K^+) und Kalzium- (Ca^{2+}) Kanälen steuern (Abb. 3). Während CNR2 vorwiegend in Zellen des Immunsystems gebildet wird, wird CNR1 sowohl im ZNS wie auch in der Peripherie ubiquitär exprimiert (Pagotto et al. 2006). Im Gehirn ist eine besonders hohe Dichte an CNR1 u.a. im Hypothalamus, Zerebellum, Kortex und Hippokampus vorhanden (Osei-Hyiaman et al. 2005a). Im ZNS ist CNR1 vorwiegend in der Membran präsynaptischer Neuronen lokalisiert, wo CNR1 durch die Modulation der intrazellulären Ca^{2+} und K^+ Konzentrationen die Aktivität weiterer G-Protein gekoppelter Rezeptoren sowie die Expression und Sekretion verschiedener Neurotransmitter beeinflusst (Matias et al. 2008, Abb. 3).

Im humanen Genom ist *CNR1* auf Chromosom 6q15 lokalisiert. *CNR1* hat eine Größe von 26,18 kb und umfasst vier Exons, wobei lediglich Exon 4 kodierend ist. Im ZNS werden mindestens fünf Splicevarianten exprimiert, wobei mRNAs, die das untranslatierte Exon 1 sowie das kodierende Exon 4 enthalten, am weitesten verbreitet sind (Zhang et al. 2004).

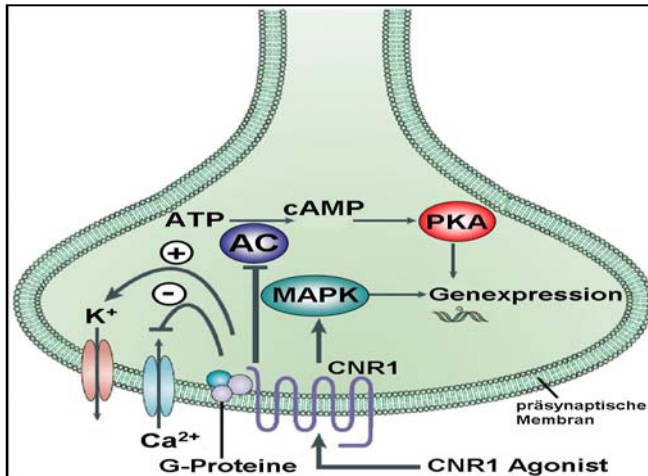


Abbildung 3: Signaltransduktion des CNR1. Die Bindung eines Agonisten an den CNR1 führt über die Aktivierung von G-Proteinen zu einer Hemmung der Adenylat Zykklase (AC) sowie der Proteinkinase A (PKA). Die 'mitogen aktivierte Proteinkinase' (MAPK) wird dagegen durch die Bindung eines Agonisten stimuliert, was u.a. die Expression verschiedener Gene beeinflusst. Die CNR1 Aktivierung führt weiterhin zu einer Hemmung von in die Zelle führenden Ca²⁺ Kanälen sowie zu einer Stimulation von aus der Zelle führenden K⁺ Kanälen. Aus Di Marzo et al. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:771-784, verändert.

Einfluss vom CNR1 auf die Nahrungsaufnahme

In Studien an *CNR1 KO* Mäusen (*CNR1*^{-/-}) sowie in Experimenten mit selektiven CNR1 Antagonisten zeigte sich, dass der orexigene Effekt der Cannabinoide auf deren agonistischen Wirkung am CNR1 basiert. Der bekannteste selektive CNR1 Antagonist ist Rimonabant, ein Diarylpyrazol, das erstmals von Rinaldi-Carmona et al. (1994) beschrieben wurde. Die Applikation von Rimonabant führt sowohl bei *WT* Mäusen, als auch bei adipösen *ob/ob* und *db/db* Mäusen, nicht jedoch bei *Cnr1*^{-/-} Mäusen zu einer Inhibition der Nahrungsaufnahme (Di Marzo et al. 2001). Weiterhin hemmt Rimonabant die orexigene Wirkung von Δ⁹-THC (Verty et al. 2005), Anandamid (Gomez et al. 2002) und 2-AG (Kirkham et al. 2002).

Der genaue Mechanismus, über den CNR1 die Nahrungsaufnahme beeinflusst, ist bislang nicht vollständig geklärt. Verschiedene Studien deuten aber darauf hin, dass CNR1 eine multifunktionale Bedeutung bei der Regulation der Energiehomöostase hat, indem CNR1 einerseits in zentralen Arealen, wie dem Hypothalamus, die Expression und Sekretion verschiedener Neurotransmitter beeinflusst (Osei-Hyiaman et al. 2005b, Matias et al. 2008) und andererseits in peripheren Organen, v.a. der Leber, Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche u.a. den Glukose- und Fettstoffwechsel beeinflussen (Cota et al. 2003, Lichtman und Cravatt 2005).

Peripherer Einfluss von dem CNR1 auf die Energiehomöostase

Cnr1^{-/-} Mäuse zeigen einen dünnen Phänotyp, nehmen im Vergleich zu *WT* Mäusen nach einer Futterrestriktion weniger Nahrung auf (Di Marzo et al. 2001) und sind resistent gegenüber diätinduzierter Adipositas (DIO, Ravinet Trillou et al. 2004). Die Fütterung einer fettreichen Diät führt bei *WT* Mäusen zur Entwicklung einer DIO, indem u.a. *Cnr1* in der Leber die Lipogenese durch eine gesteigerte Expression der Transkriptionsfaktoren *Srebp-1c* (sterol regulatory element binding protein 1c) und *Acetyl-CoA Karboxylase 1* stimuliert (Lichtman und Cravatt 2005). Die *Cnr1* Blockade durch Rimonabant führt dagegen bei diätinduziert adipösen Ratten (Thornton-Jones et al. 2006) und Mäusen (Ravinet Trillou et al. 2003) zu einer Senkung der Körperfettmasse, indem in der Leber die Lipolyse durch eine gesteigerte Expression der Transkriptionsfaktoren *Karnitin Azytransferase (Crat)* und *Karnitin Palmitoyltransferase II (Cpte2)* stimuliert wird (Jbilo et al. 2005).

Zentraler Einfluss von dem CNR1 auf die Energiehomöostase

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass CNR1 die Nahrungsaufnahme u.a. über das leptinerg-melanokortinerge System des Hypothalamus beeinflusst. Das ECS steht dabei unter negativem Einfluss von Leptin; adipöse Tiere mit gestörter Leptinsignalweiterleitung (*ob/ob* und *db/db* Mäuse sowie *fa/fa* Ratten) zeigen im Verhältnis zu *WT*-Tieren eine stark erhöhte Konzentration an Anandamid und 2-AG im Hypothalamus und die Applikation von Leptin führt sowohl bei *WT*-Ratten als auch bei *ob/ob* Mäusen zu einer Senkung der hypothalamischen Endocannabinoidspiegel (Di Marzo et al. 2001). Weiterhin wird CNR1 in mehreren Arealen des Hypothalamus (ARC, PVN, DMN, VMN) mit verschiedenen anorexigenen und orexigenen Neuropeptiden, wie *Cart*, *Crh* und *Mch* koexprimiert (Cota et al. 2003). Außerdem wird der orexigene Effekt von Ghrelin durch eine selektive Blockade des CNR1 fast vollständig inhibiert (Tucci et al. 2004).

Nutzung selektiver CNR1 Antagonisten in der pharmakologischen Behandlung der humanen Adipositas

Aufgrund seiner gewichtsreduzierenden Wirkung wird Rimonabant (Acomplia®) auch zur pharmakologischen Behandlung der humanen Adipositas eingesetzt. Die gewichtsreduzierende Wirkung von Rimonabant wurde kürzlich in mehreren plazebo-kontrollierten Studien bestätigt (Van Gaal et al. 2005, Despres et al. 2005, Pi-Sunyer et al. 2006). In einer groß angelegten Studie an 1.507 adipösen Personen konnten Van Gaal et al. (2005) zeigen, dass die Kombination aus einer hypokalorischen Diät

(600 kcal/Tag) und der täglichen Behandlung mit 5 bzw. 20 mg Rimonabant nach 12 Monaten zu einer dosisabhängigen Reduktion des Körpergewichts führt; die mit Plazebo behandelten Personen nahmen durchschnittlich 1,8 kg ab, während mit 5 mg bzw. 20 mg Rimonabant behandelte Personen durchschnittlich 3,4 kg bzw. 6,6 kg an Gewicht verloren (Van Gaal et al. 2005). Zudem zeigte sich nach der Behandlung mit 20 mg Rimonabant eine deutliche Verbesserung von kardiovaskulären Risikofaktoren; HDL-Cholesterin nahm zu während LDL-Cholesterin sowie Serumtriglyzeride abnahmen. Die Behandlung mit Rimonabant (Acomplia®) ist allerdings umstritten, da verschiedene Studien auf eine Zunahme neuropsychiatrischer Störungen, wie u.a. Ängstlichkeit und Depressionen hindeuten (Christensen et al. 2007, Rucker et al. 2007).

Molekulargenetische Befunde zum CNR1 sowie zur MGLL und NAAA

Zu Beginn dieser Dissertation lagen weder zum *CNR1* noch zu der *MGLL* und der *NAAA* Assoziationsstudien bezüglich Adipositas vor. Ebenso wurde bislang in adipösen Individuen noch kein Mutationsscreen im *CNR1* beschrieben.

Zahlreiche Studien untersuchten jedoch bereits die mögliche Assoziation genetischer Varianten im *CNR1* mit verschiedenen neuropsychiatrischen Störungen, wie Schizophrenie (Leroy et al. 2001, Seifert et al. 2007), Gilles de la Tourette Syndrom (Gadzicki et al. 1999, 2004), Anorexia nervosa (Siegfried et al. 2004) sowie Alkohol- (Schmidt et al. 2002, Preuss et al. 2003, Zhang et al. 2004) und Drogenmissbrauch (Comings et al. 1997, Heller et al. 2001, Zhang et al. 2004, Herman et al. 2006). Die Ergebnisse sind dabei kontrovers.

Zhang et al. (2004) untersuchte die Assoziation verschiedener SNPs im *CNR1* mit multiplem Drogenmissbrauch und identifizierte im 5' Bereich von *CNR1* einen C-C Haplotyp, der aus den niederfrequenteren Allelen der SNPs rs754387 und rs2180619 gebildet wird und in europäischstämmigen Amerikanern mit multiplem Drogenmissbrauch assoziiert ist. Ein weiterer Haplotyp, an dem u.a. der kodierende SNP rs1049353 beteiligt ist, war dagegen nur in afrikanischstämmigen Amerikanern mit Drogenmissbrauch assoziiert. Der im Intron 2 vom *CNR1* liegende SNP rs2023239 war dagegen sowohl bei afrikanisch- wie auch europäischstämmigen Amerikanern mit Drogenmissbrauch assoziiert, ebenso wie der im Intron 2 bzw. Exon 3 liegende Haplotyp gebildet aus SNP rs806379 (T-Allel), rs1535255 (A-Allel) und rs2023239 (G-Allel) (Zhang et al. 2004). In funktionellen Studien konnte

weiterhin gezeigt werden, dass der TAG-Haplotyp im zerebralen Kortex sowie dem Mittelhirn zu einer erniedrigten Expression von *CNR1* führt (Zhang et al. 2004). Andere Studien konnten dagegen die Assoziation des TAG-Haplotyps mit Drogenmissbrauch nicht bestätigen (Herman et al. 2006). Zudem zeigte sich, dass der von Zhang et al. (2004) als TAG bezeichnete Haplotyp korrekterweise als TGC-Haplotyp bezeichnet werden muss (Herman et al. 2006, Müller et al. 2007).

Schmidt et al. (2002) beschrieb die Assoziation des *CNR1* SNP rs1049353 A/A Genotyps mit Alkoholmissbrauch, jedoch konnte der Befund in einer anderen Studie nicht bestätigt werden (Preuss et al. 2003). Auch Berichte über die Assoziation des rs1049353 A-Allels mit Drogenmissbrauch (Zhang et al. 2004) konnten in anderen Studien nicht bestätigt werden (Heller et al. 2001, Hopfer et al. 2006). Ebenso zeigte sich keine Assoziation von rs1049353 mit dem Gilles de la Tourette Syndrom (Gadzicki et al. 1999, 2004), Schizophrenie (Seifert et al. 2007, Hamdani et al. 2008) und Anorexia nervosa (Müller et al., *eingereicht*).

Während keinerlei Assoziationsstudien bezüglich der *NAAA* vorliegen, untersuchte bislang lediglich eine Studie die mögliche Assoziation genetischer Varianten in der *MGLL* mit Alkoholmissbrauch, wobei jedoch keine Assoziation der untersuchten SNPs mit Alkoholmissbrauch festgestellt werden konnte (Iwasaki et al. 2007).

1.6.2 Das *FTO* ('fat mass and obesity associated') Gen

Die Assoziation genetischer Varianten in FTO mit Adipositas

Im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie (GWA) für T2DM wurden kürzlich mehrere miteinander im Kopplungsungleichgewicht liegende SNPs im Intron 1 des *FTO* ('fat mass and obesity associated') Gens identifiziert, welche sowohl mit T2DM als auch mit Adipositas assoziiert waren (Frayling et al. 2007). Die stärkste Assoziation mit T2DM zeigte SNP rs9939609 ($p = 5 \times 10^{-8}$). Nach Adjustierung für den BMI verschwand jedoch die Assoziation von rs9939609 mit T2DM, was darauf hindeutete, dass diese Assoziation tatsächlich auf einer Assoziation mit dem BMI beruhte. Die Assoziation von rs9939609 mit Adipositas konnte in 13 unabhängigen Kollektiven an insgesamt 38.759 Individuen bestätigt werden und eine zusammenfassende Metaanalyse zeigte, dass homozygote Träger des rs9939609 A-Allels durchschnittlich 3 kg schwerer sind als homozygote Träger des Nicht-Risikoallels und ein 31 % erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Adipositas haben; jede Kopie des A-Allels führt durchschnittlich zu einer BMI-Erhöhung von 0,4 kg/m².

(additives Vererbungsmuster; Frayling et al. 2007). Verschiedene weitere europäische Studien konnten eindrucksvoll zeigen, dass genetische Varianten in *FTO* sowohl bei Erwachsenen (Frayling et al. 2007, Dina et al. 2007b, Scuteri et al. 2007, Peeters et al. 2007, Hunt et al. 2008) als auch bei Kindern und Jugendlichen (Frayling et al. 2007, Dina et al. 2007b, Hinney et al. 2007) mit Adipositas assoziiert sind. Während die Assoziation von rs9939609 und anderer genetischer Varianten im *FTO* Gen mit Adipositas übereinstimmend in zahlreichen europäischen Studien gezeigt wurde, konnten einige Studien an Asiaten diese Befunde zunächst nicht bestätigen (Li et al. 2008, Ohashi et al. 2007), was u.a. durch die deutlich geringe Allelfrequenz des zu Adipositas prädisponierenden Allels zu erklären sein könnte (Allelfrequenz des rs9939609 A-Allels in der asiatischen Bevölkerung nach HapMap HCB: 0.122; in der europäischen Bevölkerung nach HapMap CEU: 0.450). Neuere Untersuchungen an asiatischen Studiengruppen mit adäquaten Stichproben konnten die Assoziation von rs9939609 mit Adipositas jedoch unlängst bestätigen (Hotta et al. 2008, Cha et al. 2008).

Die weltweit erste genomweite Assoziationsstudie (GWA) für frühmanifeste (extreme) Adipositas

Die Essener Gruppe um Prof. Dr. Johannes Hebebrand und Dr. Anke Hinney führte kürzlich die weltweit erste GWA für frühmanifeste (extreme) Adipositas durch, bei der *FTO* als neues Polygen für Adipositas bestätigt wurde. Bei der Studie, die auf dem Affymetrix 'Genome-Wide Human SNP Array 5.0' basierte, wurden genomweit 440.794 SNPs in 487 deutschen (extrem) adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 442 untergewichtigen Kontrollen genotypisiert (Hinney et al. 2007). Für jeden SNP wurde die mögliche Assoziation mit Adipositas unter der Annahme von vier genetischen Vererbungsmodellen untersucht (additiv, rezessiv, dominant und allelisch), wobei die Wahrscheinlichkeit für das zu Grunde liegen eines additiven Modells für polygenetische Erkrankungen am größten ist (Hill et al. 2008). Alle SNPs mit einer Frequenz des selteneren Allels (engl. minor allele frequency, MAF) von mindestens 10 % wurden nach ihren nominalen p-Werten sortiert. Dabei zeigte sich, dass sechs im LD liegende SNPs im Intron 1 des *FTO* Gens eine starke Assoziation mit frühmanifestester (extremer) Adipositas zeigen; die sechs *FTO* SNPs waren unter den besten 15 SNPs der gesamten GWA (Hinney et al. 2007, Abb. 4). Die stärkste Assoziation mit Adipositas zeigte SNP rs1121980 ($p_{\text{nominal}} = 1,13 \times 10^{-7}$; Odds Ratio (OR)_{TC} 1,67; 95% Konfidenzintervall (CI) 1,22 – 2,27; OR_{TT} 2,76; 95% CI 1,88 – 4,03)

Einleitung

welcher selbst nach empirischer Korrektur für multiples Testen eine signifikante Assoziation mit Adipositas zeigte ($p_{\text{koriert}} = 0,0494$). Die besten zwei SNPs wurden anschließend in 644 unabhängigen deutschen Adipositasfamilien genotypisiert, wobei die Assoziation beider SNPs mit frühmanifesten (extremen) Adipositas bestätigt werden konnte ($p_{\text{koriert}} = 0,0011$ bzw. $0,003$; Hinney et al. 2007).

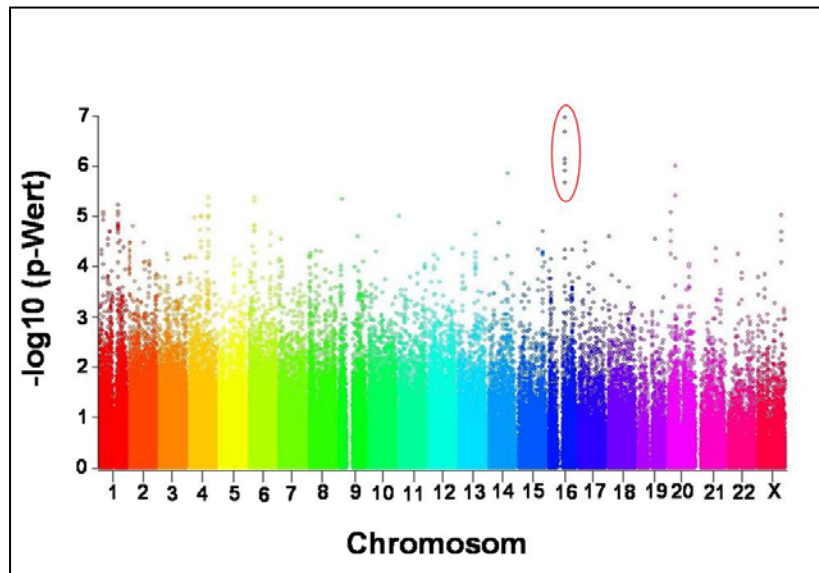


Abbildung 4: Ergebnis der Genotypisierung von 440.794 SNPs (Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 5.0) an 487 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 442 untergewichtigen Kontrollen (additives Modell). Die sechs *FTO* SNPs kennzeichnet ein rotes Oval. Nach Hinney et al. 2007.

Die *Ft* (*Fused Toes*) Maus

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ulrich Rüther beschrieb 1994 eine durch transgene Insertion entstandene *ft* Maus (*ft* für engl. 'fused toes'), welche eine 1,6 Mb Deletion auf Chromosom 8 trägt (Van der Hoeven et al. 1994, Peters et al. 2002). Während homozygote Träger der dominant vererbten *ft* Mutation während der Embryonalentwicklung aufgrund starker Missbildungen von u.a. Gehirn und Herz sterben, sind heterozygote Mutationsträger u.a. durch eine Syndaktylie der Vordergliedmaßen sowie durch eine massive Thymushyperplasie gekennzeichnet (Van der Hoeven et al. 1994, Götz et al. 2005). Bei der *ft* Maus wurden durch die Deletion insgesamt sechs Gene eliminiert, drei davon sind Mitglieder der an der Embryonalentwicklung beteiligten 'Iroquois Homebox' Proteine (*Ir3*, *Ir5*, *Ir6*), die anderen drei Gene (*Fts*, *Ftm*, *Fto*) kodieren Proteine mit bislang unbekannter Funktion (Peters et al. 2002). Das *Fto* Gen wurde 1999 durch positionelle Klonierung identifiziert und erhielt aufgrund seiner Größe von 352,9 kb zunächst den Namen

‘*Fatso*’ (von engl. Dickerchen, Peters et al. 1999). Später wurde *Fto* (oder in Bezug auf das humane Genom: *FTO*) aufgrund seiner Beteiligung an der Gewichtsregulation in ‘*fat mass and obesity associated*’ umbenannt.

Lokalisation und mögliche Funktionen von *FTO*

Das humane *FTO* Gen liegt auf Chromosom 16q12.2, also einer Region, die bereits in einer Metaanalyse als für Adipositas relevanter Kopplungspeak bestätigt wurde (Saunders et al. 2007). Das Transkript umfasst 410,3 kb und enthält 9 Exons, welche in ein Protein mit 505 Aminosäuren translatiert werden. Ein Vergleich der Proteinsequenz verschiedener Spezies mittels der „Blat“ Funktion des UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) zeigt, dass die humane *FTO* Proteinsequenz mit anderen Spezies zu 99,6% (Schimpanse), 89,0% (Ratte), 88,8% (Maus), 78,2% (Huhn) bzw. 75,0% (*C. elegans*) übereinstimmt, also insgesamt hoch konserviert ist. Die Funktion von *FTO* ist bislang unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *FTO* ubiquitär exprimiert wird, wobei eine besonders hohe Konzentration im Hypothalamus sowie der Hypophyse vorhanden ist (Dina et al. 2007b, Gerken et al. 2007), was darauf hindeutet, dass *FTO* evtl. eine Rolle in der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (HPA-Achse) spielen könnte (Dina et al. 2007b). Jüngste Studien deuten weiterhin darauf hin, dass *FTO* eine 2-Oxoglutaratabhängige Nukleinsäuredemethylase ist und möglicherweise die Expression von an der Gewichtsregulation beteiligter Gene über Veränderungen des Methylierungsmusters beeinflusst (Gerken et al. 2007). Weitere Studien deuten zudem auf eine Beteiligung von *FTO* im melanokortinergen System des Hypothalamus hin, da *FTO* in hoher Konzentration in für die Nahrungsaufnahme relevanten Regionen des Hypothalamus (u.a. ARC, LHA, PVN) nachgewiesen wurde (Gerken et al. 2007, Stratigopoulos et al. 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die hypothalamische Expression von *FTO* im ARC bei für 48 std gefasteten Mäusen um 60 % ansteigt, wobei dieser Anstieg unabhängig dem fasteninduzierten Abfall der Serumleptinspiegel ist (Gerken et al. 2007). Eine andere Studie konnte diesen Befund jedoch unlängst nicht bestätigen; ein Futterentzug für 40 std führte sowohl bei adipösen *ob/ob* Mäusen als auch bei wildtypischen Kontrollen zu einem signifikanten Abfall der hypothalamischen *Fto* Expression (Stratigopoulos et al. 2008). Zudem zeigten Mäuse mit monogenen Formen der Adipositas (*ob/ob*, *db/db*, *A^Y*, *tub/tub* und *fat/fat*) eine geringere Expression von *Fto* im mesenchymalen Fettgewebe als wildtypische Kontrollen (Stratigopoulos et al. 2008).

2. Ziel der Studie

Gene des Endocannabinoidsystems; CNR1, NAAA sowie MGLL

Eine Reihe von Vorbefunden deuten darauf hin, dass sowohl der Cannabinoidrezeptor 1 (*CNR1*) als auch die für die Degradation der Endocannabinoide verantwortlichen Enzyme N-Azylethanolamin-hydrolysierende Acid Amidase (*NAAA*) sowie die Monoglyceridlipase (*MGLL*) potentielle Kandidatengene für humane Adipositas darstellen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte deshalb untersucht werden, ob verschiedene selektiv ausgewählte genetische Varianten in dem *CNR1*, in der *NAAA* sowie in der *MGLL* mit frühmanifester (extremer) Adipositas assoziiert sind. Die Analyse der Fettsäureamidhydrolase (FAAH) erfolgte im Rahmen zweier medizinischer Dissertationen (Wandolski und Carri; ebenfalls aus der Essener Gruppe um Prof. Dr. Johannes Hebebrand und Dr. Anke Hinney).

In dieser Arbeit sollten acht SNPs in dem *CNR1*, vier SNPs in der *NAAA* sowie drei SNPs in der *MGLL* mittels PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse (PCR-RFLP), allelspezifischer PCR (ARMS-PCR) bzw. 'Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight' (MALDI-TOF) Massenspektrometrie bei 368 Adipositastrios (extrem adipöser Indexpatient sowie beide biologischen Eltern) genotypisiert werden. Die mögliche Assoziation mit frühmanifester (extremer) Adipositas sollte anschließend mittels Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT) untersucht werden. Sollte eine Assoziation bzw. ein Trend für eine Assoziation festgestellt werden, sollten die entsprechenden Varianten bei weiteren 235 unabhängigen Adipositasfamilien (adipöser Indexpatient, mindestens ein adipöses Geschwisterkind und beide biologischen Eltern) analysiert werden.

Des Weiteren sollte mittels Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP; von engl. single stranded conformation polymorphism analyses) sowie dHPLC (von engl. denaturing High Performance Liquid Chromatography) untersucht werden, ob sich in der kodierenden Region von dem *CNR1* bislang unbekannte bzw. 'private' (seltene) Mutationen oder Polymorphismen befinden, die für die Gewichtsregulation relevant sind.

FTO ('fat mass and obesity associated') Gen

Die Assoziation des *FTO* SNP rs9939609 sowie weiterer genetischer Varianten in *FTO* mit Adipositas konnte bereits sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern und Jugendlichen in zahlreichen Studien nachgewiesen werden. Das *FTO* Gen gilt dementsprechend als ein gut validiertes Polygen für Adipositas.

Im Rahmen dieser Studie sollte mittels allelspezifischer PCR (ARMS-PCR) und anschließendem Cochran-Armitage Test untersucht werden, ob Träger des zu Adipositas prädisponierenden Risikoallels von SNP rs9939609 (A-Allel) während einer 12 monatigen Adipositas-Interventionstherapie weniger Gewicht verlieren, als Träger des nicht mit Adipositas assoziierten Allels. Dazu sollte initial zuvor untersucht werden, ob die bereits beschriebene Assoziation von SNP rs9939609 mit frühmanifester (extremer) Adipositas in diesem Kollektiv deutscher (extrem) adipöser Kinder und Jugendlicher bestätigt werden kann. Des Weiteren sollte die mögliche Assoziation von rs9939609 mit verschiedenen Parametern des Glukose- und Fettstoffwechsels (Glukose, Triglyzeride, HDL- und LDL- Cholesterin) in diesem Kollektiv deutscher (extrem) adipöser Kinder und Jugendlicher mittels Cochran-Armitage Test untersucht werden.

Zu Beginn dieser Dissertation waren weder Studien bezüglich der Assoziation genetischer Varianten in dem *CNR1*, in der *MGLL* oder in der *NAAA* mit Adipositas publiziert, noch wurde bislang ein Mutationsscreen in der kodierenden Region von *CNR1* in adipösen Individuen beschrieben. Ebenso war der Einfluss des *FTO* SNP rs9939609 auf den Gewichtsverlauf durch eine Adipositas-Interventionstherapie sowie auf Parameter des Glukose- und Fettstoffwechsels unbekannt.

3. Material und Methoden

3.1 Das Studienkollektiv

Das Kollektiv dieser Studien bestand aus deutschen (extrem) adipösen Kindern und Jugendlichen, gegebenenfalls deren adipösen Geschwistern und biologischen Eltern sowie aus normalgewichtigen Erwachsenen.

3.1.1 Rekrutierung der Probanden

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte von Mitarbeitern der folgenden Arbeitsgruppen / Kliniken:

- Prof. Dr. Johannes Hebebrand / Dr Anke Hinney; Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps-Universität Marburg
- Prof. Dr. Johannes Hebebrand / Dr Anke Hinney; Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Universität Duisburg-Essen
- PD Dr. Thomas Reinehr; Vestische Kinderklinik Datteln, Universität Witten/Herdecke
- Prof. Dr. Christian L. Roth; Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn, Zentrum für Kinderheilkunde, Abteilung für Allgemeine Pädiatrie und Poliklinik

Mit den Probanden und gegebenenfalls deren Eltern und Geschwistern wurden durch Mitarbeiter der o.g. Kliniken detaillierte Interviews zur Gewichtsanamnese, Erfassung soziodemographischer Daten sowie organischer Erkrankungen durchgeführt. Jeder Studienteilnehmer wurde über die molekulargenetischen Studien aufgeklärt und unterzeichnete eine entsprechende Einverständniserklärung. Im Falle von Minderjährigen wurde die Einverständniserklärung von dem/den Erziehungsberechtigten unterschrieben. Für alle Studien lag eine schriftliche Bewilligung durch die Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg, Universität Duisburg-Essen, Universität Bonn oder Universität Witten/Herdecke vor. Alle Studien wurden in Übereinkunft mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

3.1.2 Das Adipositas-Interventionsprogramm 'Obeldicks'

Ein Teil der Probanden waren Teilnehmer des Adipositas-Interventionsprogramms 'Obeldicks' der Vestischen Kinderklinik Datteln. Die Rekrutierung erfolgte von der Gruppe von PD Dr. Thomas Reinehr (Universität Witten/Herdecke). Das Interventionsprogramm bestand aus einer einjährigen ernährungs- und bewegungsphysiologischen Therapie für die betroffenen Kinder sowie einer Beratungstherapie für deren Eltern. Zu Beginn und am Ende der Therapie wurde der BMI der Teilnehmer bestimmt sowie Blutproben entnommen, woraus in standardisierten Laboren verschiedene Blutparameter (u.a. Triglyzeride, Glukose, LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin) gemessen wurden. Die Blutproben wurden morgens entnommen, nachdem die Probanden über Nacht gefastet hatten. Die BMI-Verlaufsdaten sowie die vorhandenen Blutparameter wurden für diese Studie von PD Dr. Reinehr zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Für die Teilnahme an den Studien galten folgende Voraussetzungen:

Adipöse Kinder und Jugendliche:

- frühmanifeste Adipositas
- BMI \geq 90. Altersperzentile
- keine syndromale Form der Adipositas
- Ausschluss organischer Erkrankungen, die das Körpergewicht beeinflussen
- Nikotinkonsum von weniger als 10 Zigaretten pro Tag
- keine Dauermedikation, die das Körpergewicht beeinflusst

Normalgewichtige Kontrollen:

- BMI \geq 40. und \leq 60. Altersperzentile
- keine organischen Erkrankungen
- Nikotinkonsum von weniger als 10 Zigaretten pro Tag
- keine Dauermedikation, die das Körpergewicht beeinflusst

Für die Eltern der adipösen Kinder und Jugendlichen galten keine eingeschränkten Kriterien für die Rekrutierung. Das einzige Kriterium bei der Rekrutierung der adipösen leiblichen Geschwisterkinder war, dass der BMI über der 90. Altersperzentile liegen musste. Ausgeschlossen von den Analysen wurden Väter, bei denen während der Genotypisierung Zweifel an der leiblichen Vaterschaft aufkamen.

3.1.4 Deskriptive Statistik der Studienteilnehmer

Im Rahmen dieser Studien wurden sowohl Fall-Kontroll wie auch familienbasierte Assoziationsstudien durchgeführt. Die deskriptive Statistik der Studienteilnehmer ist in Tab. 3 dargestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Studienkollektivs

Studiengruppe		N	Geschlecht ³	Alter (Jahre) Mittelwert \pm SD	BMI (kg/m ²) Mittelwert \pm SD	BMI-Perzentile Mittelwert \pm SD
Trios	Indexpatienten ¹	364	155 (m) 209 (w)	13,71 \pm 3,09	31,85 \pm 6,06	98,96 \pm 1,92
	Eltern	728	364 (m) 364 (w)	42,78 \pm 6,09	30,0 \pm 6,23	79,35 \pm 25,24
Quartette	Indexpatienten ¹	235	102 (m) 133 (w)	13,40 \pm 2,63	32,28 \pm 5,91	99,25 \pm 1,48
	Geschwister	276	127 (m) 139 (w)	15,15 \pm 5,09	28,57 \pm 5,29	97,37 \pm 2,85
	Eltern	470	235 (m) 235 (w)	43,06 \pm 5,81	31,07 \pm 6,03	83,87 \pm 21,87
adipöse Probanden	Indexpatienten ¹	519	249 (m) 270 (w)	10,71 \pm 3,10	28,88 \pm 5,23	99,00 \pm 1,26
Kontrollen	NG ²	178	70 (m) 108 (w)	24,58 \pm 2,56	21,76 \pm 1,08	49,69 \pm 6,84

¹ die Indexpatienten der einzelnen Studiengruppen sind voneinander unabhängig; ² NG: Normalgewichtige; ³ m: männlich, w: weiblich

3.2 Auswahl der untersuchten SNPs

Die Auswahl der untersuchten SNPs basierte auf molekularen, funktionalen, physiologischen sowie genetischen Erkenntnissen. Die untersuchten SNPs wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- Es sollte möglichst das ganze Gen (bzw. alle Haplotypen) mit SNPs abgedeckt werden (tagSNPs)
- Es sollten SNPs (bzw. Haplotypen) berücksichtigt werden, zu denen Hinweise auf eine molekulare und/oder funktionale Relevanz bestanden
- SNPs, die keine Haplotypen mit bekannter Relevanz bilden, sollten zueinander nicht im (kompletten) Kopplungsungleichgewicht (LD) stehen
- Die SNPs sollten eine Frequenz des selteneren Allels (MAF) von mindestens 10 % haben

Material und Methoden

Eine Zusammenfassung der untersuchten SNPs ist in Tab. 4 dargestellt. Die Abb. 5, 6 und 7 zeigen die Position der SNPs in dem *CNR1* (Abb. 5), in der *NAAA* (Abb. 6) bzw. in der *MGLL* (Abb. 7).



Abbildung 5: Position der im *CNR1* untersuchten SNPs. Die Pfeile markieren die Position der SNPs in dem *CNR1* Transkript. In Klammern ist die Entfernung in Nukleotiden vom A-Allel des Translationsstarts (ATG) sowie die Art des Basenaustausches angegeben. Die Balken markieren die Exons, die zwischen den Balken liegende Bereiche stellen Introns dar. Schwarze Balken markieren kodierende Bereiche, weiße Balken nicht-kodierende Bereiche. Nach Zhang et al.; *Mol Psychiatry* 2004;9:916-931, verändert.

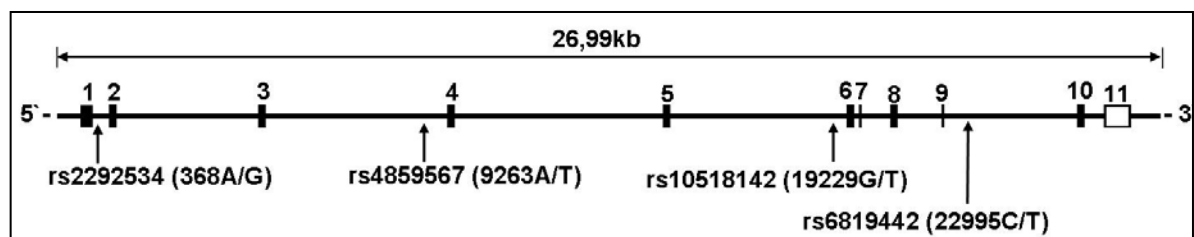


Abbildung 6: Position der in der *NAAA* untersuchten SNPs. Die Pfeile markieren die Position der SNPs in dem *NAAA* Transkript. In Klammern ist die Entfernung in Nukleotiden vom A-Allel des Translationsstarts (ATG) sowie die Art des Basenaustausches angegeben. Die Balken markieren die Exons, die dazwischen liegenden Bereiche die Introns. Schwarze Balken markieren kodierende Bereiche, weiße Balken nicht-kodierende Bereiche. Die Intron/Exon Beschreibung basiert auf Angaben des Ensembl Datenbankeintrag NCBI36:4:77050833:77081190:-1.

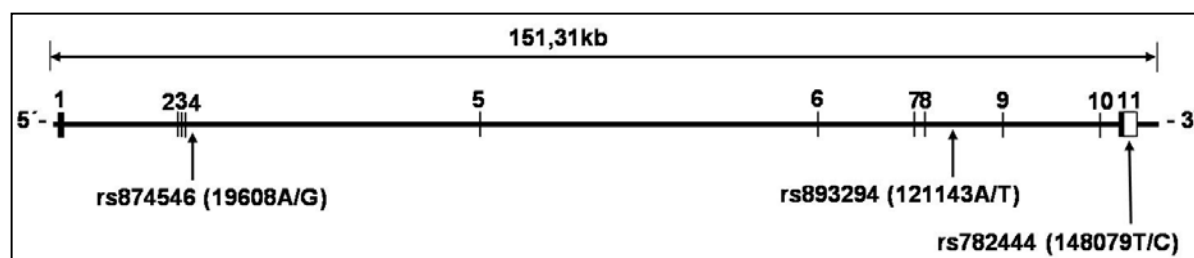


Abbildung 7: Position der in der *MGLL* untersuchten SNPs. Die Pfeile markieren die Position der SNPs in dem *MGLL* Transkript. In Klammern ist die Entfernung in Nukleotiden vom A-Allel des Translationsstart (ATG) sowie die Art des Basenaustausches angegeben. Schwarze Balken markieren kodierende Bereiche, weiße Balken nicht-kodierende Bereiche. Die Intron/Exon Beschreibung basiert auf Angaben des Ensembl Datenbankeintrag NCBI36:3:128890001:129041309:-1.

Material und Methoden

Tabelle 4: In dieser Arbeit analysierte SNPs

Gen ¹	Chr ²	SNP	Position ^{3,4}	Lokalisation	Vorbefunde	Referenz
<i>CNR1</i>	6q15	rs9353527	-25.046A/G	Putativer Promoter	unbekannt	
<i>CNR1</i>	6q15	rs754387	-23.866C/A	Putativer Promoter	C-Allel assoziiert mit multiplem Drogenmissbrauch	Zhang et al. 2004
<i>CNR1</i>	6q15	rs6454676	-22.462G/A	Putativer Promoter	unbekannt	
<i>CNR1</i>	6q15	rs806379	-6.274A/T	Intron 2	TGC-Haplotyp assoziiert mit multiplem Drogenmissbrauch	Zhang et al. 2004
<i>CNR1</i>	6q15	rs1535255	-6.215T/G	Intron 2		
<i>CNR1</i>	6q15	rs2023239	-5.489T/C	Exon 3		
<i>CNR1</i>	6q15	rs806370	-1.338C/T	Intron 3	unbekannt	
<i>CNR1</i>	6q15	rs1049353	1.359G/A	Exon 4	A/A Genotyp assoziiert mit Alkoholabusus	Schmidt et al. 2002
<i>NAAA</i>	4q21.1	rs2292534	368A/G	Intron 1	unbekannt	
<i>NAAA</i>	4q21.1	rs4859567	9.263A/T	Intron 3	unbekannt	
<i>NAAA</i>	4q21.1	rs10518142	19.229G/T	Intron 5	unbekannt	
<i>NAAA</i>	4q21.1	rs6819442	22.995C/T	Intron 9	unbekannt	
<i>MGLL</i>	3q21.3	rs874546	19.608T/C	Intron 4	unbekannt	
<i>MGLL</i>	3q21.3	rs893294	121.143A/T	Intron 8	unbekannt	
<i>MGLL</i>	3q21.3	rs782444	148.079A/G	Exon 11	unbekannt	
<i>FTO</i>	16q12.2	rs9939609	82.431A/T	Intron 1	A-Allel assoziiert mit Adipositas	Frayling et al. 2007 Hinney et al. 2007 Peeters et al. 2007 Scuteri et al. 2007 Hunt et al. 2008

¹ *CNR1*: Cannabinoidrezeptor 1; *NAAA*: N-Azylethanolamin-hydrolysierende Acid Amidase; *MGLL*: Monoglyceridlipase; *FTO*: 'fat mass and obesity associated' Gen; ² Chr: Chromosomale Region; ³ Die Bezeichnung der Allele ist entsprechend den Angaben der dbSNP; die Zahl gibt jeweils die Entfernung in Nukleotiden vom A-Allel des Translationsstarts (ATG) an und basiert auf den genomischen Sequenzen der Ensembl Datenbankeinträge NCBI36:6:88905702:88932985:-1 (*CNR1*), NCBI36:4:77050833:77081190:-1 (*NAAA*) bzw. NCBI36:3:128890001:129041309:-1 (*MGLL*); ⁴ Der TGC-Haplotyp in dem *CNR1* besteht aus den niederfrequenteren Allelen der SNPs rs806379 (T-Allel), rs1535255 (G-Allel) und rs2023239 (C-Allel).

3.3 Verwendete Chemikalien

Im Rahmen dieser Studie wurden die in Tab. 5 gezeigten Chemikalien verwendet:

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
10 x Puffer	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland
100 x Bovine Serum Albumin; BSA (100 µg/ml)	NEB, Frankfurt, Deutschland
100 bp Größenmarker (Ladder)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril (C ₂ H ₃ N)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>aqua bidest.</i>	DeltaSelekt GmbH, Dreieich, Deutschland
Borsäure	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Desoxynukleosidtriphosphate; dNTP (20 mM)	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland
Eisessig	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99 % (C ₂ H ₅ OH)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll Type 400	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Formamid <i>deion.</i>	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) (25 mM)	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ EDTA	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
`Oragene™ DNA self collection kit`	DNA Genotek Inc., Ontario, Canada
Primer (25 pmol/µl)	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland
Pronase E (10 mg/ml)	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland
Salzsäure (HCL)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salpetersäure (HNO ₃)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat (AgNO ₃)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Taq Polymerase (5 U/µl)	Sigma Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland
Tetramethylethyldiamid (TEMED)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triethylammoniumacetat (TEAA)	Transgenomics Limited, Glasgow, UK
Tris-HCL 99,9 % (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.4 Isolation der DNA-Proben

3.4.1 Isolation der DNA aus Vollblut

Die Isolation der DNA aus Leukozyten erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Miller et al. (1988). Dabei werden Zellbestandteile mittels einer Proteinase lysiert und zelluläre Proteine durch Dehydration mit Hilfe einer gesättigten Kochsalzlösung ausgefällt. Das Ausfällen der DNA erfolgt anschließend durch Zugabe von Ethanol.

Verwendete Lösungen:

Die verwendeten Lösungen sind in Tab. 6 dargestellt. Alle Lösungen wurden mit *aqua bidest.* auf das angegebene Volumen aufgefüllt und mit Salzsäure (HCL) auf den angegebenen pH-Wert eingestellt.

Tabelle 6: Für die DNA-Isolation verwendeten Lösungen

Erythrozyten-Lysepuffer (ELB) (pH 7,6)	g / 1000 ml	Pronase Reaktionsmix	Volumen je Reaktion (µl)
Tris-HCL (10 mM)	1,21	SE-Puffer	5000
MgCl ₂ (5 mM)	1,02	SDS (10 %)	500
NaCl (10 mM)	0,58	Pronase E (10 mg/ml)	25
SE-Puffer (pH 8)	g / 500 ml	TE-Puffer (pH 8)	g / 1000 ml
NaCl (75 mM)	2,2	Tris-HCL (10 mM)	1,21
Na ₂ EDTA (25 mM)	4,2	EDTA (1 mM)	0,37

Durchführung:

Zunächst wurden 10 – 20 ml EDTA Blut mit 30 ml eisgekühltem Erythrozyten-Lysepuffer (ELB) versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4°C (4000 U/min) wurde der Überstand dekantiert und der Rückstand in 25 ml ELB aufgenommen. Danach wurden die Proben für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4°C (4000 U/min) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 5,5 ml Pronase-Mix aufgenommen. Zur Proteolyse wurden die Proben über Nacht bei 37°C im Wasserbad unter leichtem schütteln inkubiert. Das im Pronase-Mix enthaltene anionische Detergenz Natriumlaurylsulfat (SDS) sowie der SE-Puffer unterstützen dabei durch Denaturierung von Proteinen den Zellverdau durch die Pronase E. Nach der Proteolyse wurde je Reaktion 5 ml SE-Puffer zugegeben und unter leichtem schütteln für 10 min bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Zur Ausfällung von Protein-SDS Komplexen wurden je Reaktion 2,5 ml 5 M NaCl-

Lösung zugegeben und geschüttelt. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur (RT) für 15 min (4000 U/min) zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt, mit Ethanol (99,9 %) auf 45 ml aufgefüllt und per Hand langsam geschwenkt, woraufhin die DNA als weißliche Ausflockung ausfiel. Nach etwa 30 min wurde die DNA mit einem Glashäkchen aufgefangen, in 500 µl TE-Puffer (Tab. 6) überführt und für 1 - 2 std bei 50°C im Wasserbad gelöst.

3.4.2 Isolation der DNA aus Speichel

Die Isolation der DNA aus Speichel erfolgte, den Angaben des Herstellers folgend, mit dem `OrageneTM DNA self collection kit` (DNA Genotek Inc., Ontario, Canada).

Durchführung:

Nachdem der Proband den Spuckbehälter bis zu einer bestimmten Markierung mit Speichel gefüllt hatte, wurde der Behälter verschlossen, wodurch die im Schraubverschluss befindliche Kammer aufbrach und sich der darin befindliche Puffer mit dem Speichel vermischte. Der Behälter wurde anschließend für 1 std bei 50°C im Wasserbad erwärmt. Danach wurde der Inhalt auf vier Eppendorfgefäße aufgeteilt und zum Ausfällen der Proteine mit je 40 µl `Oragene Purifier` versetzt. Die Proben wurden anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 3 min bei RT (13.000 U/min) wurde der Überstand überführt und mit 4 ml Ethanol (95 %) versetzt. Nach leichtem Schwenken war die DNA als weißliche Ausflockung zu erkennen. Die Proben wurden für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei RT und 3.500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Eppendorfgefäß mit offenem Deckel getrocknet. Anschließend wurden 500 µl TE-Puffer auf das Pellet gegeben und über Nacht bei RT inkubiert.

3.5 Konzentrationsbestimmung der DNA (Quantifizierung)

Die Quantifizierung der der DNA-Stammlösung erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm mittels Photometer (NanoDrop[®] ND-1000; NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA), wobei die Absorption einer Einheit ($OD_{260nm} = 1$) einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Die Konzentration (C) der doppelsträngigen DNA (dsDNA) errechnete sich aus der OD_{260nm} , dem Verdünnungsfaktor (V) sowie einem für dsDNA spezifischen Multiplikationsfaktor (F; bei dsDNA = 50 µg/ml) nach der unter [2] genannten Formel.

$$C = OD_{260nm} \times V \times F$$

[2]

3.6 Verdünnung der DNA-Proben

Nach der Quantifizierung wurde ein Teil von jeder Probe mit *aqua bidest.* auf 20 ng/µl verdünnt. Die verdünnten Proben wurden anschließend auf 96-well Mikrotiterplatten verteilt und bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Der Rest der Verdünnungen sowie die Ursprungslösungen wurden bei -80°C aufbewahrt.

3.7 *In-Vitro* Amplifizierung von DNA-Fragmenten

3.7.1 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. Polymerase-Chain-Reaction; PCR) ist ein standardisiertes Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung definierter DNA-Sequenzen (Saiki et al. 1988). Da die PCR eine gut etablierte Standardmethode darstellt, wird das Reaktionsprinzip hier nur kurz erläutert.

Die PCR basiert auf der zyklischen Wiederholung von drei Reaktionsschritten, 1.) Trennung der DNA-Doppelstränge bei 94°C (Denaturierung), 2.) Anbindung (Annealing) zweier synthetischer Oligonukleotide (Primer) und 3.) Strangverlängerung (Elongation) des zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnitts durch die *Taq*-Polymerase bei 72°C. Die optimale Annealingtemperatur der Primer ist sequenzabhängig und kann entweder annäherungsweise über die unter [3] genannte Faustformel berechnet werden, oder kann mittels einer PCR im Temperaturgradientencycler bestimmt werden.

$$T_{\text{Ann}} = 2 \times n_A + 2 \times n_T + 4 \times n_G + 4 \times n_C$$

[3]

T_{Ann} = Annealingtemperatur des Primers (°C)

n_A = Anzahl der Adeninbasen im Primer

n_T = Anzahl der Thyminbasen im Primer

n_G = Anzahl der Guaninbasen im Primer

n_C = Anzahl der Cytosinbasen im Primer

Durchführung:

Für Jede 96-well Mikrotiterplatte wurde ein in Tab. 7 gezeigtes Reaktionsgemisch (Mastermix) hergestellt. Je Probe wurde 1,25 µl DNA in eine 96-well PCR-Platte (Abgene, Hamburg, Deutschland) vorgelegt und mit je 10,75 µl Mastermix vermischt. Als Indikator für Kreuzkontaminationen diente eine 1,25 µl Wasserprobe, welche ebenfalls mit 10,75 µl Mastermix vermischt wurde (Negativkontrolle). Die Amplifizierung der DNA erfolgte im Thermocycler (PD-100; BioRad GmbH, München,

Material und Methoden

Deutschland), wobei das in Tab. 8 gezeigte Programm verwendet wurde. Die optimale Annealingtemperatur der Primer sowie die optimale Konzentration an $MgCl_2$ wurde zuvor in einer Etablierungs-PCR im Gradientencycler (PD-200, BioRad GmbH, München, Deutschland) ermittelt.

Tabelle 7: PCR-Mastermix

Reagenzien	Volumen je Reaktion (µl)	Endkonzentration je Probe
<i>aqua bidest.</i>	8,775	
10x Puffer	1,250	1x
$MgCl_2$ (25 mM)	0,750	1,5 mM/µl
Primer F (25 pmol/µl)	0,125	0,25 pmol/µl
Primer R (25 pmol/µl)	0,125	0,25 pmol/µl
dNTP (20 mM)	0,125	0,2 mM/µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,100	0,5 U/Reaktion
DNA (20 ng/µl)	1,250	2 ng/µl

Tabelle 8: PCR-Zyklen

Anzahl der Zyklen	Vorgehen	Dauer	Temperatur
1	Denaturierung	5 min	94°C
35	Denaturierung	30 sek	94°C
	Annealing	30 sek	T_A^1
	Elongation	30 sek	72°C
1	Elongation	10 min	72°C
1	Kühlung	∞	4°C

¹ T_A : primerspezifische Annealingtemperatur

3.7.2 Primerdesign und Qualitätskontrolle

Die Auswahl der Primer erfolgte mittels des Programms 'Primer3' (<http://frodo.wi.mit.edu/>), wobei folgende Kriterien beachtet wurden:

- jeder Primer sollte eine Länge von etwa 20 Nukleotiden haben
- in der Primersequenz sollten keine Polymorphismen liegen
- der Gehalt an Guanin und Cytosin sollte etwa 40 – 60 % betragen
- die Primer sollten keine palindromischen Sequenzen enthalten
- das 3' Ende sollte nicht mehr als 3 Guanin- oder Cytosinbasen enthalten

Material und Methoden

Die Primer wurden mit *aqua bidest.* auf eine Konzentration von 1000 pmol/μl verdünnt. Aus dieser Stammlösung wurden dann für den weiteren Gebrauch Verdünnungen mit einer Konzentration von 25 pmol/μl hergestellt.

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 9 gezeigt. Für den Mutationsscreen in der kodierenden Region vom *CNR1* wurden Primerpaare gewählt, die den zu screenenden Bereich in fünf überlappende Fragmente zerteilen. Die gescreente Sequenz ist im Anhang (8.2) dargestellt.

Tabelle 9: PCR-Primer für die Analysen im *CNR1*

Gen ¹	Bezeichnung	Sequenz	T _M (°C) ²	GC (%) ³	Produkt
<i>CNR1</i>	rs806379_F	5'-CCC ATC CCT TAC CCA TGT CT-3'	64,7	55,0	430 bp
	rs806379_R	5'-TCC AAC CAG TCA AAG CAC CT-3'	64,6	50,0	
<i>CNR1</i>	rs2023239_F	5'-AGG CTC AGT GTC ACC AGT CC-3'	64,5	60,0	752 bp
	rs2023239_R	5'-TCC CTA TAT CCC AGC CAC CT-3'	64,4	55,0	
<i>CNR1</i>	Fragment 1_F	5'-CTC TTA GGA TTG CCC CCT GT-3'	64,1	55,0	298 bp
	Fragment 1_R	5'-CAC CTG GTC TGC TGG GAC TA-3'	65,2	60,0	
<i>CNR1</i>	Fragment 2_F	5'-GTC CCT TCC AAG AGA AGA TGA-3'	62,1	47,6	400 bp
	Fragment 2_R	5'- AAC ACG TTG CGG CTA TCT TT-3'	63,4	45,0	
<i>CNR1</i>	Fragment 3_F	5'-CAG GCC TTC CTA CCA CTT CA-3'	67,3	54,6	418 bp
	Fragment 3_R	5'-CAG AAG CAG TAC GCT GGT GA-3'	64,2	55,0	
<i>CNR1</i>	Fragment 4_F	5'-TTG CCT GAT GTG GAC CAT A-3'	63,5	50,0	429 bp
	Fragment 4_R	5'-GCA AAC GTC TTA ATG AGC -3'	63,4	47,6	
<i>CNR1</i>	Fragment 5_F	5'-TCT GCT TGC AAT CAT GGT GT-3'	64,4	45,0	465 bp
	Fragment 5_R	5'-CAC CTT TTC ATT GAG CAT GG-3'	63,0	45,0	

¹ *CNR1*: Cannabinoidrezeptor 1; ² Schmelztemperatur der Primer; ³ der prozentuale Gehalt von Guanin und Cytosin in der Primersequenz

3.8 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Größenbestimmung und Trennung amplifizierter DNA-Fragmente. In einer speziellen Elektrophoresekammer wird dabei die mittels PCR amplifizierte DNA in die Taschen eines mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer; Tab. 10) überschichteten Agarosegels gefüllt und an ein elektrisches Feld angeschlossen. Da die Phosphatgruppen des Phosphodiesterückgrats der DNA negativ geladen sind, wandert die DNA von der Kathode durch das Agarosegel in Richtung Anode, wobei kleinere Fragmente aufgrund des geringeren Widerstandes im Gel schneller wandern als größere Fragmente. Die Größenbestimmung der Fragmente erfolgt durch den Vergleich mit

Material und Methoden

Fragmenten mit bekannter Größe. Die Färbung der DNA in dem Gel erfolgt mittels Ethidiumbromid (EtBr), welches zwischen die Basen der DNA interkaliert, wodurch sich die Fluoreszenz unter ultraviolettem (UV) Licht um den Faktor 50 - 100 erhöht. Die Lichtintensität ist dabei direkt proportional der DNA-Konzentration.

Durchführung:

Zur Herstellung eines 2,5 %-igen Agarosegels wurden 12,5 g Agarose mit 500 ml 1xTAE-Puffer (Tab. 10) vermischt und aufgekocht. Die Agarose wurde dann auf 60°C abgekühlt, mit 15 µl EtBr vermischt und in einen Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Probenkamm entfernt und je Probe 3 µl des PCR-Produktes mit 4 µl Auftragspuffer (Tab. 11) vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Anschließend wurde ein elektrisches Feld von 240 V und 400 mA angelegt. Die mit EtBr gefärbten DNA-Fragmente wurden nach der Auftrennung im Agarosegel auf einem UV-Schirm (PEQLAB GmbH, Erlangen, Deutschland) digital fotografiert.

Tabelle 10: TAE und TBE-Puffer; der pH Wert wurde mit HCL auf pH = 8,3 (TAE) bzw. pH = 8,0 (TBE) eingestellt. Der Puffer wurde entsprechend den im Text angegebenen Konzentrationen mit *aqua bidest.* verdünnt.

50xTAE Puffer			10xTBE Puffer		
Reagenzien	1000 ml	Endkonzentration	Reagenzien	1000 ml	Endkonzentration
Tris	242 g	2 M	Tris	108 g	0,89 M
Eisessig	57,1 ml	2 M	Borat	55 g	0,89 M
EDTA (0,5 M)	100 ml	0,05 M	EDTA	8,3 g	0,02 M
<i>aqua bidest.</i>	<i>ad. 1000 ml</i>		<i>aqua bidest.</i>	<i>ad. 1000 ml</i>	

Tabelle 11: Auftragspuffer

Reagenzien	g/100 ml
Bromphenolblau	0,25 g
Xylenxyanol	0,25 g
Ficoll 400	15,0 g
EDTA	4,46 g
<i>aqua bidest.</i>	<i>ad. 100 ml</i>

3.9 Methoden zur Genotypisierung und Mutationsverifizierung

3.9.1 PCR-Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (PCR-RFLP)

Die PCR-RFLP ist eine Methode zur Genotypisierung bekannter Punktmutationen und basiert auf der Grundlage, dass durch eine Punktmutation eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym geschaffen oder zerstört wird. Bei dem Verfahren wird ein mittels PCR amplifizierter DNA-Bereich mit einem Restriktionsenzym behandelt,

Material und Methoden

welches die DNA in Abhängigkeit des zu Grunde liegenden Genotyps schneidet. Die Bestimmung des Genotyps erfolgt anschließend mittels Agarosegelelektrophorese.













Neben der Genotypisierung von bereits bekannten Sequenzvarianten (SNPs) diene die PCR-RFLP im Rahmen dieser Studie auch zur Zerteilung von PCR-Fragmenten für den Mutationsscreen, sowie zur Verifizierung von neu identifizierten Mutationen.

Die in dieser Studie verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tab.12 dargestellt. Die Auswahl der Enzyme erfolgte mittels des Onlineprogramms NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

Durchführung:

Je Probe wurde 9 µl des PCR-Produktes sowie 0,5 – 1 U Enzym, 0,3 µl BSA und 3 µl des vom Hersteller angegebenen 10xPuffers eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit *aqua bidest.* auf 30 µl aufgefüllt und für 3 – 16 std bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und der zu Grunde liegende Genotyp anhand der Fragmentgröße bestimmt. Zur Kontrolle der Genotypisierung wurde bei jeder 96-well Platte eine Probe mit bekanntem Genotyp analysiert (Positivkontrolle).

Tabelle 12: Verwendete Restriktionsenzyme für die Analysen im *CNR1*

Enzym	Verwendung	Allele	Erkennungssequenz ¹	NEB 10xPuffer ²	Produktgröße nach der Behandlung mit dem Restriktionsenzym (bp)
<i>Tsp509I</i>	PCR-RFLP (rs806379)	A/T	5'...  AATT...3' 3'...TTAA  ...5'	1	A: 133+106+77+42+33+29+10 T: 133+116+77+42+33+29
<i>HpyCH4IV</i>	PCR-RFLP (rs2023239)	C/T	5'...  ACGT...3' 3'...TGCA  ...5'	1	C: 441+311 T: 752
<i>HhaI</i>	PCR-RFLP (c.1256C>A)	C/A	5'...  GCGC...3' 3'...  GCGC...5'	2	C: 465 A: 342+123
<i>NlaIII</i>	SSCP (Fragment 1)	/	5'...CATG  ...3' 3'...  GTAC...5'	4	181+117
<i>TfiI</i>	SSCP (Fragment 4)	/	5'...  CTCGAG...3' 3'...GAGCT  ...5'	3	214+215
<i>HhaI</i>	SSCP (Fragment 5)	/	5'...  GCGC...3' 3'...  GCGC...5'	2	283+182

¹ die schwarzen Pfeile markieren die Schnittstellen des Enzyms innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz; ² der von der Firma NEB (New England Biolabs) mitgelieferte 10x Puffer

3.9.2 Allelspezifische Polymerase-Ketten-Reaktion (ARMS-PCR)

Die allelspezifische PCR (ARMS-PCR, von engl. Amplification Refractory Mutation System - PCR, Newton et al. 1989) diente der Genotypisierung von bekannten Punktmutationen, welche keine Restriktionsschnittstelle erzeugen oder zerstören und somit nicht mittels PCR-RFLP genotypisiert werden konnten.

Bei der ARMS-PCR werden vier Primer verwendet. Die zwei äußeren Primer führen unabhängig des zu Grunde liegenden Genotyps zu einer Amplifikation des zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnitts. Die zwei inneren Primer (F_{in} und R_{in}) sind allelspezifisch, wobei die letzte Base am 3' Ende entweder komplementär zum Wildtypallel oder der Mutation ist. Je nachdem, welcher Genotyp vorliegt, bindet also entweder der eine oder andere der beiden inneren Primer an die DNA und führt zusammen mit einem der äußeren Primer zur Amplifikation des entsprechenden DNA-Fragments. Die allelspezifische Anbindung der Primer wird zusätzlich durch einen Fehlbase (engl. Mismatch) in der dritten Base des Primers (vom 3' Ende aus gesehen) unterstützt. Da sich die aus den Primerpaaren F_{in} und R_{out} sowie R_{in} und F_{out} gebildeten Fragmente in ihrer Größe unterscheiden, können diese elektrophoretisch getrennt und der zu Grunde liegende Genotyp anhand der Fragmentgröße bestimmt werden.

Im Rahmen dieser Studie wurde der *CNR1* SNP rs1535255 sowie der *FTO* SNP rs9939609 mittels ARMS-PCR genotypisiert. Die dazu verwendeten Primer sind in Tab. 13 gezeigt. Die Auswahl der Primer erfolgte mit dem Onlineprogramm 'Tetra-Primer ARMS-PCR' (http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html).

Tabelle 13: Sequenzen der verwendeten ARMS-Primer

Gen ¹	Bezeichnung	Sequenz	T _M (°C) ²	GC (%) ³
<i>CNR1</i>	rs1535255_ F_{in}	5'-CAT TAT TGT CAT CAT CCT CAT CCT CA-3'	66,6	38,5
	rs1535255_ F_{out}	5'-AAG GCA ATG AGC ATT CTT GAG ATA TAA T-3'	65,4	32,2
	rs1535255_ R_{in}	5'-TTC TAA GCC TCA GTA TTT CAT CTG TAA GAG-3'	64,6	36,7
	rs1535255_ R_{out}	5'-ACC ATC TCT CTA AGC TAA GAC AGG GAT A-3'	65,1	42,9
<i>FTO</i>	rs9939609_ F_{in}	5'-TAG GTT CCT TGC GAC TGC TGT GAA TAT A-3'	69,6	42,9
	rs9939609_ F_{out}	5'-TGG CTC TTG AAT GAA ATA GGA TTC AGA A-3'	68,9	35,7
	rs9939609_ R_{in}	5'-GAG TAA CAG AGA CTA TCC AAG TGC ATC TCA-3'	68,1	43,3
	rs9939609_ R_{out}	5'-AGC CTC TCT ACC ATC TTA TGT CCA AAC A-3'	66,2	44,5

¹ *CNR1*: Cannabinoidrezeptor 1; *FTO*: 'fat mass and obesity associated' Gen; ² Schmelztemperatur der Primer; ³ der prozentuale Gehalt von Guanin und Cytosin in der Primersequenz

Material und Methoden

Durchführung:

Die Durchführung der ARMS-PCR erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 12,5 µl je Probe in den in Tab. 14 gezeigten Reaktionsansätzen. Anschließend durchliefen die Proben im Thermocycler die in Tab. 8 gezeigten Zyklen. Danach erfolgte, wie unter 3.8 beschrieben, die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente im Agarosegel.

Tabelle 14: Reaktionsansatz für die ARMS-PCR

	CNR1		FTO	
	rs1535255		rs9939609	
Reagenzien	Volumen (µl)	Endkonzentration je Probe (12,5 µl)	Volumen (µl)	Endkonzentration je Probe (12,5 µl)
DNA (20 ng/µl)	1,5	2,4 ng/µl	1,5	2,4ng/µl
<i>aqua bidest.</i>	8,5		8	
10xPuffer	1,25	1x	1,3	1x
MgCl ₂ (25 mM)	0,5	1 mM/µl	1	2 mM/µl
Primer F _{out} (6,25 pmol/µl)	0,13	0,07 pmol/µl	0,13	0,07 pmol/µl
Primer F _{in} (25 pmol/µl)	0,13	0,26 pmol/µl	0,13	0,26 pmol/µl
Primer R _{out} (6,25 pmol/µl)	0,13	0,07 pmol/µl	0,13	0,07 pmol/µl
Primer R _{in} (25 pmol/µl)	0,13	0,26 pmol/µl	0,13	0,26 pmol/µl
dNTP (20 mM)	0,13	0,2 mM/µl	0,13	0,2 mM/µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,1	0,5 U/Reaktion	0,1	0,5 U/Reaktion

3.9.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry) ist ein Verfahren, um die molekulare Masse von Biomolekülen zu bestimmen. Das Verfahren basiert auf der Grundlage, dass die Zeit, welche ionisierte Biomoleküle in einem Vakuum für das zurücklegen einer definierten Strecke benötigen, direkt von dem Molekulargewicht der Ionen abhängt.

Da sich die vier Nukleotide der DNA anhand ihrer molekularen Masse unterscheiden, können auch SNPs mittels MALDI-TOF analysiert werden. Die zu untersuchenden DNA-Moleküle werden dabei in einer Matrix aus 3-Hydroxypikolinsäure eingebettet. In einem Vakuumsystem wird dann ein Laserimpuls auf die Matrix gelenkt, wodurch die Matrix die Moleküle unter Ionisation ins Vakuum freisetzt. Die freigesetzten Ionen werden dann in einem elektrostatischen Feld auf eine konstante kinetische Energie (E_{kin}) beschleunigt und treffen nach einer genau definierten Strecke (L) auf einen Detektor. Dieser misst die Zeit (t), welche die Ionen für die Strecke (L) benötigen und errechnet daraus die Geschwindigkeit (v) der Ionen nach folgender Formel [4].

$$v = L / t$$

[4]

Bei konstanter E_{kin} und errechneter Geschwindigkeit (v) kann nun die Masse der ionisierten Biomoleküle anhand folgender Formel bestimmt werden [5].

$$m = 2 \times (E_{\text{kin}} / v^2)$$

[5]

In dieser Studie wurden die in Tab. 15 gezeigten SNPs mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie genotypisiert. Die Genotypisierung der SNPs erfolgte im Labor von PD Dr. Thomas Illig am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Meitinger. Die Vorbereitung der zu analysierenden DNA-Proben erfolgte mittels sog. Primerextensionsreaktion (Abb. 8). Dabei wurde für jeden SNP ein Primer verwendet, dessen 5' Ende direkt vor dem zu untersuchenden Nukleotid endet. In Abhängigkeit des untersuchten Genotyps wurde der Primer dann mittels eines spezifischen Desoxyribonukleotids (dNTP) bzw. Didesoxyribonukleotiden (ddNTP) um ein bis zwei Allele verlängert und der zu Grunde liegende Genotyp über die Bestimmung der molekulare Masse der Extensionsprodukte bestimmt (Abb. 8).

Tabelle 15: Mittels MALDI-TOF analysierte SNPs

Gen ¹	SNP	Allele ²	Lokalisation
<i>CNR1</i>	rs9353527	-25046A/G	putativer Promoter
<i>CNR1</i>	rs754387	-23866C/A	putativer Promoter
<i>CNR1</i>	rs6454676	-22462G/A	putativer Promoter
<i>CNR1</i>	rs806370	-1338C/T	Intron 3
<i>CNR1</i>	rs1049353	1359G/A	Exon 4
<i>NAAA</i>	rs2292534	368A/G	Intron 1
<i>NAAA</i>	rs4859567	9.263A/T	Intron 3
<i>NAAA</i>	rs10518142	19.229G/T	Intron 5
<i>NAAA</i>	rs6819442	22.995C/T	Intron 9
<i>MGLL</i>	rs874546	19.608T/C	Intron 4
<i>MGLL</i>	rs893294	121.143A/T	Intron 8
<i>MGLL</i>	rs782444	148.079A/G	Exon 11

¹ *CNR1*: Cannabinoidrezeptor 1; *NAAA*: N-Azylethanolamin-hydrolysierende Acid Amidase; *MGLL*: Monoglyceridlipase; ² Die Bezeichnung der Allele ist entsprechend den Angaben der dbSNP; die Zahl gibt jeweils die Entfernung in Nukleotiden vom A-Allel des Translationsstart (ATG) an.

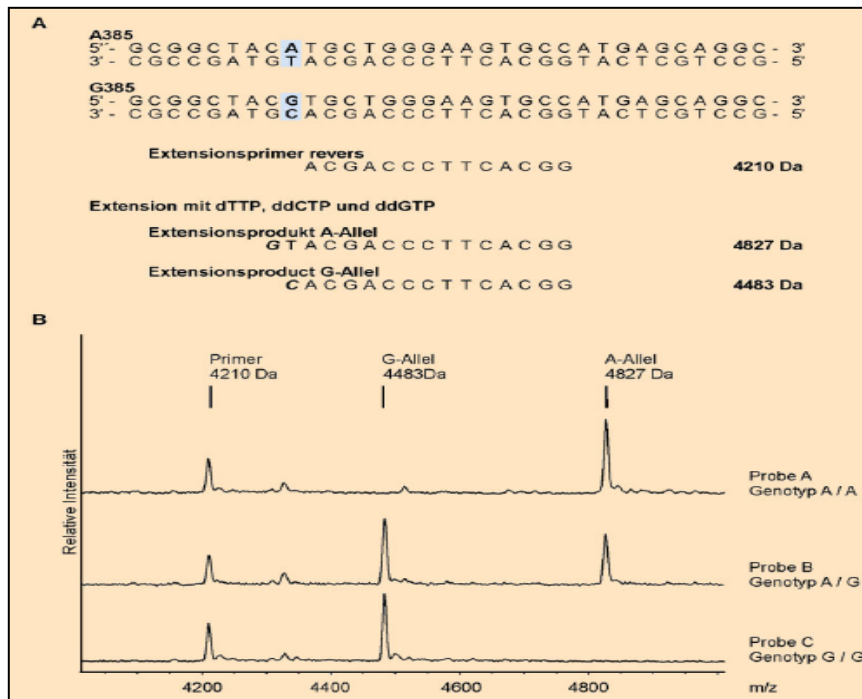


Abbildung 8: Allelspezifische Primerextensionsreaktion mittels MALDI-TOF. (A) Der Extensionsprimer endet direkt am 5' Ende vor dem zu untersuchenden SNP (blaue Markierung) und verlängert mittels dem entsprechenden dNTP bzw. ddNTP den Primer um ein bis zwei Nukleotide. (B) Der zu Grunde liegende Genotyp wird anschließend über die Bestimmung der molekularen Masse des Extensionsproduktes bestimmt. Aus Humey A. *Chem unserer Zeit* 2003;37:380-387.

3.10 Methoden zur Identifikation unbekannter Mutationen

3.10.1 Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCP)

Die Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCP, von engl. single stranded conformation polymorphism analysis) ist ein erstmals von Orita et al. (1989) beschriebenes Verfahren zur Identifikation von DNA-Sequenzveränderungen.

Denaturierte DNA-Einzelstränge zeigen beim schnellen Abkühlen auf Eis die Tendenz, mit sich selbst komplementäre Basenpaarungen einzugehen, wodurch sich eine spezifische dreidimensionale Struktur (Tertiärstruktur) bildet, die u.a. von der Temperatur sowie der Sequenz der DNA abhängig ist. Die SSCP basiert auf der Grundlage, dass die Tertiärstruktur der DNA maßgeblich den Widerstand und somit die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA entlang eines Spannungsgradienten durch die Gelmatrix eines Polyacrylamidgels (PAA-Gel) beeinflusst. Somit lassen sich DNA-Sequenzunterschiede durch ein verändertes Wanderungsverhalten der DNA in einem PAA-Gel bestimmen. Die Färbung der DNA erfolgt mittels Silbernitrat, wobei die Silberionen an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA binden und durch Zugabe von alkalischem Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert werden, wodurch sich die DNA bräunlich färbt. Die detektierten

Sequenzunterschiede können anschließend durch eine Sequenzanalyse genau charakterisiert werden.

Die Sensitivität der SSCP zur Detektion von Sequenzunterschieden liegt bei etwa 80 – 90 % und kann durch die Verwendung von unterschiedlichen Temperaturen zusätzlich erhöht werden (Orita et al. 1989). Die Sensitivität ist weiterhin von der Größe des DNA-Fragments abhängig, wobei die größte Sensitivität bei einer Fragmentgröße von etwa 250 bp liegt (Xie et al. 1997), weshalb größere Fragmente zuvor mittels Restriktionsenzymen in kleinere Fragmente zerteilt werden sollten.

Im Rahmen dieser Studie wurde die kodierende Region vom *CNR1* sowie 70 Nukleotide der untranslatierten 5' Region (5' UTR) und 118 Nukleotide der untranslatierten 3' Region (3' UTR) nach Mutationen gescreent (siehe Anhang 8.2). Der Bereich umfasste insgesamt 1,608 kb und wurde mittels PCR in fünf überlappende Fragmente zerteilt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 9 gezeigt. Die Fragmente 1, 4 und 5 wurden mittels SSCP nach neuen Varianten gescreent, während die Fragmente 2 und 3 mittels dHPLC (siehe 3.10.2) auf neue Varianten untersucht wurden. Die Fragmente 1, 4 und 5 wurden vor dem Mutationsscreen (wie unter 3.9.1 beschrieben) mittels PCR-RFLP zerteilt. Die verwendeten Enzyme sowie die Fragmentgrößen sind in Tab. 12 dargestellt.

Durchführung:

Herstellung des Polyacrylamidgels

PAA-Gele bestehen aus einem feinen Netzwerk aus Acrylamid und N,N-Methylenbisacrylamid, wobei die Porengröße des Gels von der Konzentration des Acrylamid-Bisacrylamid-Gemisches abhängt. Die Polymerisation des Gemisches wird durch freie Radikale initiiert, welche aus dem chemischen Zerfall von Ammoniumpersulfat (APS) in Gegenwart von Sauerstoff stammen, wobei Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator dieser Reaktion dient.

Zur Herstellung eines 15 %-igen PAA-Gels wurden 28,75 ml *aqua bidest.* mit 18,75 ml Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1) sowie 2,5 ml 10xTBE-Puffer (Tab. 10) vermischt. Die Polymerisationsreaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 500 µl APS (10 %) sowie 34 µl TEMED gestartet. Nach mehrmaligem Schwenken wurde die Lösung luftblasenfrei in den Zwischenraum zweier zuvor vorbereiteter Glasplatten gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurden die Gelkammern vertikal in die SSCP-Kammer gestellt und mit 0,5xTBE-Puffer überschichtet.

Durchführung der SSCP

Je Probe wurden 3,5 µl des PCR-Produktes mit 3,5 µl *aqua bidest.* und 8 µl Ladungspuffer (Tab. 17) vermischt und für 5 min bei 94°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben umgehend auf Eis gestellt. Je Probe wurde dann 10 µl in die Taschen des PAA-Gels gefüllt. Da die Sensitivität der SSCP u.a. von der Temperatur abhängt, wurde jede Probe bei Raumtemperatur (RT) sowie 4°C untersucht. Die Proben bei RT liefen für 4,5 std bei 500 V und 300 mA während die Proben bei 4°C für 18 std bei 300 V und 240 mA liefen.

Die Silbernitratfärbung

Die Färbung der PAA-Gele erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Budowle et al. (1991). Die dazu verwendeten Lösungen zeigt Tab. 16. Zur Immobilisierung der DNA wurde das Gel unter ständigem Schwenken für 5 min mit einer Fixierlösung aus 10 % Ethanol und 0,5 % Eisessig behandelt. Zur Vorbereitung der Silbernitratfärbung wurde das Gel anschließend für 10 min in 1 %-iger Salpetersäure geschwenkt und mit *aqua bidest.* gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 20 - 30 min mit einer 12 mM Silbernitratlösung behandelt. Nachdem das Gel mit *aqua bidest.* von überschüssigem Silbernitrat befreit wurde, erfolgte die Behandlung mit einer alkalischen Entwicklerlösung aus Natriumkarbonat und Formaldehyd. Nachdem die DNA-Banden gut sichtbar waren, wurde die Reaktion durch Behandlung mit einer Stopplösung aus Eisessig und *aqua bidest.* beendet und das Gel für 10 min in einer Glyzerollösung geschwenkt, um ein Reißen des Gels nach dem Trocknen zu verhindern. Anschließend wurden die Gele auf einem Filterpapier in einem Vakuumtrockner für etwa 160 min getrocknet.

Tabelle 16: Für die SSCP verwendeten Lösungen

Fixierlösung	Volumen	Entwicklerlösung (280 mM)	Volumen
Ethanol (99,9 %)	100 ml	5x Natriumkarbonatlösung (1,4 M)	200 ml
Eisessig	5 ml	Formaldehyd (37 %)	0,514 ml
<i>aqua bidest.</i>	<i>ad. 1000 ml</i>	<i>aqua bidest.</i>	<i>ad. 1000 ml</i>
10x Silbernitratlösung (0,12 M)	Volumen	1x Silbernitratlösung (12 mM)	Volumen
Silbernitrat	2,04 g	10x Silbernitratlösung (0,12 M)	50 ml
<i>aqua bidest.</i>	<i>ad. 100 ml</i>	<i>aqua bidest.</i>	<i>ad. 500 ml</i>
Stopplösung	Volumen	5x Natriumkarbonatlösung (1,4 M)	Volumen
Eisessig (99,9 %)	100 ml	Natriumkarbonat	148,4 g
<i>aqua bidest.</i>	<i>ad. 1000 ml</i>	<i>aqua bidest.</i>	<i>ad. 1000 ml</i>

Tabelle 17: Ladungspuffer für die SSCP

Ladungspuffer	Konzentration
EDTA (0,5 M)	0,5 M
Formamid, <i>deionisiert</i>	20 %
Glyzerin	1 %
Bromphenolblau	0,25 %

3.10.2 Mutationssuche mittels dHPLC

Die Identifizierung von Mutationen mittels dHPLC (denaturing High-Performance Liquid Chromatography) basiert auf einer temperaturmodulierten Heteroduplexanalyse von PCR-Produkten. Die mittels PCR amplifizierten DNA-Doppelstränge werden durch Hitze (94°C) denaturiert und lagern sich beim langsamen Abkühlen bei Raumtemperatur wieder zu Doppelsträngen zusammen. Trägt einer der beiden Stränge eine Punktmutation, können bei der Renaturierung nicht-komplementäre Basenpaare einander gegenüberliegen, was zur Bildung von Heteroduplexen (Abb. 9) führt. Da sich die wildtypischen und mutierten DNA-Einzelstränge bei der Renaturierung zufällig aneinander lagern, entstehen Homo- und Heteroduplexe im Verhältnis von 1:1, wobei sowohl wildtypische, wie mutierte Homoduplexe gebildet werden (Abb. 9).

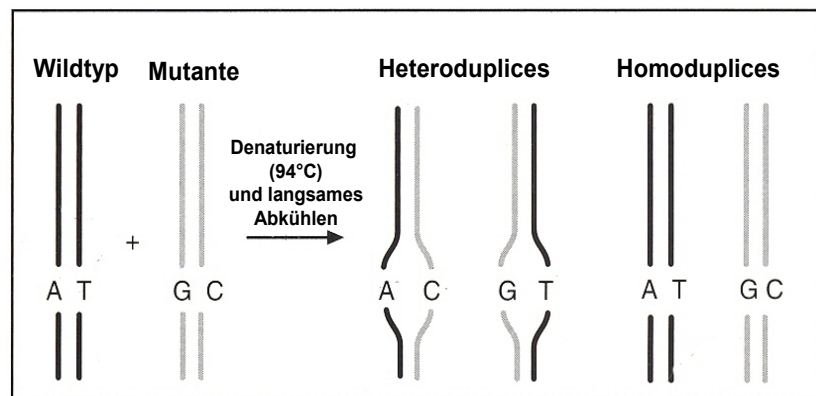


Abbildung 9: Bildung von Homo- und Heteroduplexen bei der dHPLC. Beim langsamen Abkühlen der PCR-Produkte entstehen Homo- und Heteroduplexe im Verhältnis von 1:1, wobei sowohl wildtypische wie mutierte Homoduplexe entstehen. Aus Transgenomics Application Note 101: Detection of Mutations and Polymorphisms with the WAVE® System, verändert.

Die entstandenen Heteroduplexe können nun aufgrund der veränderten physikalischen Eigenschaften des DNA-Doppelstranges mittels einer sog. Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie von den Homoduplexen unterschieden werden. Das

in dieser Studie verwendete WAVE[®] DNA-Fragment Analyse System (Transgenomics Limited, Glasgow, UK) besteht aus einer mobilen und einer stationären Phase. Die stationäre Phase besteht aus einer Chromatographiesäule, die aus alkylierten, hydrophoben Polystyren-Divinylbenzol-Partikeln besteht. Eine Brückenfunktion zwischen der mobilen und stationären Phase übernimmt das amphiphile Triethylammoniumacetat (TEAA). Dessen hydrophoben Alkylketten binden an die Chromatographiesäule, woraufhin die Ammonium-Kationen des TEAA ein positives Oberflächenpotential generieren, an das die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA binden. Durch eine kontinuierlich steigende Konzentration von Acetonitril in der mobilen Phase werden die Alkylketten des TEAA gelöst, woraufhin sich die DNA von der Säule löst. Bei einer für das jeweilige Fragment optimalen Analysetemperatur werden dabei die thermolabilen Heteroduplices schneller von der Säule gewaschen als die Homoduplices. Ein UV-Detektor misst die Absorption der eluierten DNA-Fragmente in Abhängigkeit der Zeit bei einer Wellenlänge von 254 nm und veranschaulicht das Ergebnis in einem Absorptions-Zeit-Chromatogramm (Abb. 10). Bei einer für jedes Fragment spezifischen Analysetemperatur zeigt das Chromatogramm bei heterozygoten Mutationsträgern vier deutlich getrennte Peaks, wobei die ersten zwei Peaks durch die thermolabilen Heteroduplices und die letzten zwei Peaks durch die Homoduplices verursacht werden. Im Gegensatz zu heterozygot vorliegenden Mutationen, führen homozygot vorliegende Mutationen nicht zur Bildung von Heteroduplices und können deshalb nur dann mittels dHPLC detektiert werden, wenn die DNA-Probe mit einer wildtypischen DNA-Probe vermischt wird, oder wenn sich die Homoduplices in dem Temperaturoptimum unterscheiden und somit zeitversetzt eluiert werden. Die Sensitivität zur Detektion von DNA-Sequenzveränderungen beträgt etwa 95 %, wobei die Produktgröße der PCR-Fragmente zwischen 100 bp und 650 bp liegen sollte (Ellis et al. 2000).

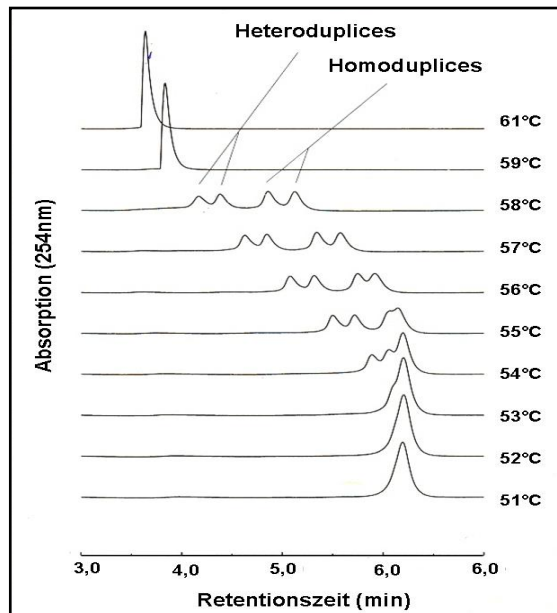


Abbildung 10: dHPLC Darstellung eines Absorptions-Zeit-Chromatogramms. Aus Transgenomics Application Note 101: Detection of Mutations and Polymorphisms with the WAVE[®] System, verändert.

Durchführung

Die dHPLC diente in dieser Studie zur Detektion von Mutationen in den *CNR1* Fragmenten 2 und 3 (siehe Anhang 8.2). Dazu wurde das WAVE[®] DNA-Fragment Analyse System (Transgenomics Limited, Glasgow, UK) verwendet. Nach initialer Amplifizierung der Fragmente mittels PCR wurden die Proben für 5 min bei 94°C denaturiert. Anschließend erfolgte das langsame Abkühlen der Proben bei RT. Danach wurden je Probe 5 µl des PCR-Produktes in eine 96-well PCR-Platte vorgelegt und in die entsprechende Apparatur der WAVE[®] gestellt. Die für jedes Fragment spezifischen Analysetemperaturen für die optimale Trennung der Homo- und Heteroduplexes wurden zuvor mit einer speziellen Software (WAVEmaker[®] Software Version 4.0, Transgenomics Limited, Glasgow, UK) ermittelt (Fragment 2: 60°C, 61°C, 64°C; Fragment 3: 60°C, 62°C, 64°C). Für die Analyse der DNA-Stränge wurden die in Tab. 18 gezeigten Puffer verwendet. Dabei wurden bedingt durch die Brückenfunktion des TEAA in Puffer A und B zunächst die DNA-Stränge auf der Chromatographiesäule gebunden. Durch die sich kontinuierlich ändernde Mischung der Puffer A und B entsteht eine linear steigende Konzentration von Acetonitril in der mobilen Phase, wodurch die DNA-Stränge schließlich von der Säule eluiert werden. Die verwendeten Mischungsverhältnisse und Zeiten sind in Tab. 18 gezeigt, wobei die Fließgeschwindigkeit der Puffer bei konstant 0,9 ml/min lag. Nach jedem Probendurchlauf wurde das System für 30 sek mit 100 % des Puffer B gereinigt und anschließend auf die Konzentration der Ausgangsbedingungen äquilibriert. Der

Material und Methoden

Puffer D diene zu Beginn und am Schluss der Messungen als Reinigungspuffer für die Einzugskanüle.

Tabelle 18: Säulenbedingungen und verwendete Puffer für die Mutationssuche mittels dHPLC

Schritt	Zeit (min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)	Puffer				
				A (ml)	B (ml)	C (ml)	D (ml)	
Beladen der Säule	0,0	53	47	TEAA (2M)	50	50	/	/
Start des Gradienten	0,5	48	52		Acetonitril	0,25	250	750
Stop des Gradienten	4,5	39	61	aqua bidest.	ad.	ad.	ad.	ad.
Start der Reinigung	0,1	0	100		1000	1000	1000	1000
Stop der Reinigung	0,5	0	100					
Äquilibrieren Start	0,1	53	47					
Äquilibrieren Stop	0,9	53	47					

3.11 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Das am häufigsten verwendete Verfahren zur DNA-Sequenzanalyse ist das Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. (1977). Das Verfahren basiert auf der Grundlage, dass während der DNA-Strangverlängerung durch die Polymerase der Einbau von Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) zu einem Kettenabbruch führt, da die 3'-OH Gruppe zur Ausbildung der Phosphodiesterbindung zum nächsten Kettenglied fehlt. Bei der klassischen Sequenzierung mittels ddNTPs werden je zu analysierender Probe vier parallele Versuchsansätze verwendet. Jeder Ansatz enthält dabei neben den vier dNTPs eines der ddNTPs. In jedem Ansatz verläuft die Kettenverlängerung solange, bis zufällig ein ddNTP eingebaut wird und die Strangsynthese abbricht. Da alle vier Ansätze die gleiche Startposition haben, spiegelt die Länge der gebildeten Fragmente in einem Reaktionsansatz die relative Position der jeweiligen Nukleotidsorte im Molekül wider und die Sequenz kann in einem PAA-Gel wie die Sprossen einer Leiter von oben nach unten abgelesen werden. Neuere Sequenzierungstechniken beruhen weitgehend auf einer Weiterentwicklung der Kettenabbruchmethode, wobei jedes der vier ddNTPs mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, wodurch die Trennung in vier parallele Ansätze entfällt. Die entstehenden Produkte werden anschließend kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und die Fluoreszenz von einem Detektor bestimmt.

Um die mittels SSCP und dHPLC identifizierten Mutationen zu charakterisieren, wurden die auffälligen Proben zusammen mit wildtypischen Proben sequenziert und verglichen. Vor der Sequenzierung wurden die Proben mittels Säulenaufreinigung von Verunreinigungen befreit.

Säulenaufreinigung der DNA-Fragmente für die Sequenzierung

Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte, der Anleitung des Herstellers folgend, mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Die Methode basiert auf Anionenaustauschersäulen, bestehend aus einer Membranmatrix, die positiv geladene Gruppen besitzt. Das Prinzip besteht darin, dass die Phosphatgruppen der DNA bei $\text{pH} \geq 2$ negativ geladen sind und an die positiv geladenen Gruppen der Säulenmembran binden, während weniger negativ geladene Proteine und Verunreinigungen ausgewaschen werden. Da die Polarität der DNA vom pH-Wert des Puffers abhängt, ist die Bindung der DNA auf der Membran reversibel und die gereinigte DNA kann durch einen Puffer mit niedrigerem pH-Wert ausgewaschen werden. Die Sequenzierung der aufgereinigten DNA-Fragmente wurde anschließend bei der Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) in Auftrag gegeben, wobei sowohl der Vorwärts- wie auch der Rückwärtsstrang sequenziert wurden. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen erfolgte anschließend mit dem Programm Lasergene 7 (DNASStar Inc., Madison, USA).

3.12 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte von Thuy Trang Nguyen unter der Leitung von Prof. Dr. Helmut Schäfer am Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg bzw. von Dr. André Scherag unter der Leitung von Prof. Dr. Karl-Heinz Jöckel am Institut für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie der Universität Duisburg-Essen.

3.12.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG)

Zu Beginn des 18. Jahrhunderts beschrieben der englische Mathematiker Hardy sowie der deutsche Arzt Weinberg unabhängig voneinander, dass die Allel- und Genotypfrequenzen eines biallelischen Markers in einer idealen Population konstant bleiben.

Besteht ein genetischer Marker aus den beiden Allelen „A“ und „a“ und beschreibt „p“ die Frequenz des A-Allels und „q“ die Frequenz des a-Allels, dann ist die Summe

dieser Frequenzen die Gesamthäufigkeit der Allele dieses Markers in einer gegebenen Population [6].

$$p + q = 1$$

[6]

Weiterhin ist die Wahrscheinlichkeit für das Zusammentreffen zweier A-Allele = p^2 und für zwei a-Allele = q^2 , während die Wahrscheinlichkeit für das Zusammentreffen beider Allele = $2 pq$ ist. Die Summe dieser Frequenzen bildet die Gesamthäufigkeit der Genotypen für diesen Marker in der gegebenen Population [7].

$$p^2 + 2 pq + q^2 = 1$$

[7]

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) gilt streng genommen nur für eine ideale Population, was bedeutet, dass die Population sehr groß ist und keine äußeren Einflüsse wie Mutation oder Migration die Vererbung beeinflussen. Ebenso wird vorausgesetzt, dass keine Selektion stattfindet und sich alle Individuen zufällig mit der gleichen Wahrscheinlichkeit miteinander fortpflanzen (Panmixie).

Obwohl in der Populationsgenetik praktisch nie ideale Populationen vorkommen, kann das HWG doch eingeschränkt auch auf nicht ideale Populationen angewendet werden. Ein Beispiel dafür ist z.B. die Berechnung der zu erwartenden Genotypverteilung in einem untersuchten Kollektiv anhand der beobachteten Allelfrequenz. Der Unterschied zwischen der beobachteten und der erwarteten Anzahl der Genotypen kann anschließend mit einem Chi-Quadrat Test (siehe 3.12.3) auf eine mögliche Signifikanz hin untersucht werden. Ergeben sich dabei signifikante Unterschiede, kann dies u.a. auf Fehler in der Genotypisierung hindeuten.

3.12.2 Wahl des Signifikanzniveaus

Im Rahmen dieser Studie wurde für einen statistischen Test ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt, d.h. der Vergleich zweier Stichproben wurde als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (d.h. das Ablehnen der Nullhypothese, obwohl diese richtig ist) kleiner oder gleich 5 % war ($p \leq 0,05$).

3.12.3 Chi-Quadrat (χ^2)Test

In der klassischen Assoziationsstudie (Fall-Kontroll Studie) wird die Häufigkeitsverteilung zweier Allele in nicht verwandten Merkmalsträgern (Fällen) mit nicht verwandten Kontrollen verglichen. Vorausgesetzt die zu untersuchende

Stichprobe ist adäquat groß, kann mit dem Chi-Quadrat (χ^2) Test überprüft werden, ob die beobachtete Verteilung der Allele vom untersuchten Phänotyp abhängt (also eine Assoziation vorliegt) oder nicht. Dazu wird zunächst eine Nullhypothese (H_0) postuliert, welche besagt, dass die Verteilung der Allele nicht vom untersuchten Phänotyp abhängt. Die Anzahl der beobachteten Allele wird dann in eine Vier-Felder-Tafel eingetragen und die Häufigkeiten berechnet, die zu erwarten wäre, wenn beide Merkmale unabhängig voneinander wären (Tab. 19). Anschließend wird für jedes der vier Felder die Differenz aus der beobachteten und der erwarteten Häufigkeit gebildet, quadriert und durch die erwartete Häufigkeit dividiert. Der χ^2 -Wert entspricht nun der Summe der entsprechenden Werte aus allen vier Zellen. Nachdem der Freiheitsgrad (in Vier-Felder-Tafel = 1) bestimmt wurde, kann der entsprechende p-Wert bei einem gegebenen χ^2 in einer Tabelle abgelesen werden. Bei einem Freiheitsgrad von eins liegt der χ^2 -Wert für $p = 0,05$ bei 3,841. Liegt der χ^2 -Wert darunter, ist der statistische Test nicht signifikant (gemäß 3.12.2) und die Nullhypothese ist nicht zu verwerfen (Fisher 1938).

Tabelle 19: Vier-Felder-Tafel für die Berechnung des χ^2 -Wertes. Die Vier-Felder, in welche die beobachteten Häufigkeiten eingetragen werden, sind fett markiert.

	Beobachtete Häufigkeit		Summe	Erwartete Häufigkeit	
	Allel 1	Allel 2	Allel 1 + 2	Allel 1	Allel 2
Fälle	a	b	$n_1 = a + b$	$n_3 / n_{\text{ges}} \times n_1$	$n_4 / n_{\text{ges}} \times n_1$
Kontrollen	c	d	$n_2 = c + d$	$n_3 / n_{\text{ges}} \times n_2$	$n_4 / n_{\text{ges}} \times n_2$
Summe	$n_3 = a + c$	$n_4 = b + d$	$n_{\text{ges}} = n_1 + n_2 = n_3 + n_4$		

3.12.4 Fisher's exakt Test

Im Gegensatz zum χ^2 -Test, der nur bei adäquat großen Stichproben zuverlässige Ergebnisse liefert, kann der Fisher's exakt Test auch bei kleinen Stichproben verwendet werden (Fisher 1938). Die Ergebnisse werden, wie beim χ^2 -Test, in eine Vier-Felder-Tafel eingetragen und der p-Wert anschließend durch folgende Formel bestimmt [8].

$$p = \frac{\binom{a+b}{a} \binom{c+d}{c}}{\binom{n_{\text{ges}}}{a+c}} = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{n_{\text{ges}}! a! b! c! d!} \quad [8]$$

3.12.5 Bonferroni Korrektur für multiples Testen

Untersucht man bei einer Assoziationsstudie mehrere genetische Marker, erhöht sich mit der Anzahl der untersuchten Marker auch die Irrtumswahrscheinlichkeit für jeden einzelnen Marker. Eine Möglichkeit, die Irrtumswahrscheinlichkeit für falsch positive Befunde aufgrund multipler Analysen zu verringern, ist die Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni (z.B. Rice et al. 2008). Dabei werden die erhaltenen p-Werte mit der Anzahl der durchgeführten Tests multipliziert. Bei den in dieser Studie dargestellten p-Werten handelt es sich um nominale, also unkorrigierte p-Werte, weshalb die dargestellten Ergebnisse rein explorativ zu bewerten sind.

3.12.6 Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT)

Der Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT) ist ein familienbasierter Test auf Assoziation in Gegenwart von Kopplung (Spielman et al. 1993). Der Test basiert auf einer Vier-Felder-Tafel, in der die Weitergabe (Transmission) bzw. Nicht-Transmission der Allele eines Markers von den Eltern an die betroffenen Indexpatienten eingezeichnet wird (Tab. 20). Bei einer unabhängig vom untersuchten Phänotyp vererbten Variante erwartet man gemäß den Mendelschen Gesetzen, dass 50 % der heterozygoten Eltern diese Variante an das betroffene Kind weitergeben. Bei einer deutlichen Abweichung von dem Erwartungswert (50 %) spricht man von einer Assoziation der Variante mit dem Phänotyp. Der χ^2 -Wert für den TDT errechnet sich nach der in [9] genannten Formel, wobei nur heterozygote Eltern in die Analysen einbezogen werden.

Tabelle 20: Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT)

		Transmittiert	
		Allel 1	Allel 2
Nicht-Transmittiert	Allel 1	a	b
	Allel 2	c	d

$$\chi^2 = (b - c)^2 / (b + c)$$

[9]

3.12.7 Pedigree-Disequilibrium-Test (PDT)

Der TDT kann in etwas abgewandelter Form auch auf Familien mit mehr als einem betroffenen Kind angewendet werden (Martin et al. 2000). Zu beachten ist dabei allerdings, dass bei diesem sog. Pedigree-Disequilibrium-Test (PDT) neben der Berücksichtigung von mehreren Kindern auch für eine Sequenzvariante homozygote Elternteile in die Analysen einfließen.

3.12.8 Cochran-Armitage Test für einen Trend und Odds Ratio

Generell wird der Cochran-Armitage Test dazu verwendet, den möglichen Trend einer binominal verteilten Variable über das Level einer kategorial verteilten Variable zu untersuchen (Fisher 1938). In dieser Studie wurde der Cochran-Armitage Test verwendet, um die mögliche Assoziation des *FTO* SNP rs9939609 mit Adipositas (Fall-Kontroll Ansatz) zu untersuchen. Der Test vergleicht dabei die Genotypfrequenzen der adipösen Indexpatienten mit denen der normalgewichtigen Kontrollen unter Einbeziehung aller drei möglichen Genotypen, wobei aufgrund der bestehenden Alternativhypothese (das *FTO* rs9939609 A-Allel ist mit Adipositas assoziiert) einseitige p-Werte berechnet wurden. Um weiterhin anzugeben, um welchen Faktor ein untersuchtes Allel bzw. Genotyp das Krankheitsrisiko beeinflusst, wird das Ergebnis zusätzlich durch das sog. Odds Ratio (OR) veranschaulicht, also den Faktor, um den das Krankheitsrisiko steigt, wenn die betreffende Person Träger des entsprechenden Risikofaktors ist. Die Unsicherheit in der Schätzung des OR wird durch die Angabe des Konfidenzintervalls (CI) verdeutlicht, welches einen Bereich der zu erwartenden Effekte bei Wiederholung des Experiments abbildet. Üblicherweise werden 95 %-ige Konfidenzintervalle berichtet, wobei ein breites Konfidenzintervall auf eine große Variabilität der Daten hindeutet.

3.12.9 Berechnung des Kopplungsungleichgewichts (LD)

Die Berechnung des Kopplungsungleichgewichts (LD) erfolgte in den Indexpatienten der Adipositastrios anhand der ermittelten Genotypfrequenzen mittels der Funktion 'Linkage Format' des Programms Haploview 4.0. Nachdem die ermittelten Genotypverteilungen jedes untersuchten SNPs in Haploview eingegeben wurden, wurde für jede mögliche Konstellation zweier SNPs aufgrund eines vorher zu definierenden Logarithmus (Solid-Spine of LD) ein sog r^2 -Wert berechnet, welcher zwischen 0 und 1 liegt und eine Aussage über den Grad des LD zwischen diesen beiden SNPs ermöglicht (0 = freie Rekombination; 1 = komplettes LD). Das Ergebnis wurde graphisch als ein sog. LD-Plot dargestellt, eine aus Quadraten bestehende Graphik, wobei jeweils das Quadrat in der Schnittfläche zweier SNPs den r^2 -Wert zwischen diesen SNPs angibt (siehe Abb. 11). Bei SNPs, die im kompletten LD zueinander stehen ($r^2 = 1$), erwartet man aufgrund absoluter Kosegregation eine nahezu identische Genotypverteilung der betreffenden SNPs in dem untersuchten Kollektiv.

4. Ergebnisse

4.1 Gene des Endocannabinoidsystems; *CNR1*, *NAAA* und *MGLL*

4.1.1 Ergebnis der familienbasierten Assoziationsstudien

Initial wurden wie beschrieben acht SNPs in dem *CNR1*, vier SNPs in der *NAAA* sowie drei SNPs in der *MGLL* mittels PCR-RFLP (3.9.1), ARMS-PCR (3.9.2) oder MALDI-TOF Massenspektrometrie (3.9.3) in jeweils 368 Adipositas-Trios genotypisiert. Die erhaltenen Genotyp- und Allelfrequenzen der Indexpatienten sind in Tab. 21 gezeigt, die der Eltern in Tab. 22. Abweichungen von der Gesamtanzahl von 368 Trios sind auf fehlgeschlagene Genotypisierungen oder Mendelfehler zurückzuführen.

Alle erhaltenen Genotyp- und Allelfrequenzen der Indexpatienten entsprachen dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p > 0,05$; Tab. 21 und 22). Ein Vergleich der erhaltenen Allelfrequenzen mit den Angaben der dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) zeigte außerdem, dass die erhaltenen Genotyp- und Allelfrequenzen mit den Angaben der dbSNP bezüglich der europäischen Population (HapMap CEU) in Einklang sind.

Bei den Eltern der Indexpatienten zeigte der *NAAA* SNP rs10518142 eine deutliche Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p = 0,001$). Ein Vergleich mit Referenzangaben der dbSNP zeigte weiterhin, dass der Anteil der Heterozygoten 11,4 % höher lag als nach den Angaben der dbSNP erwartet wurde (erwartete Heterozygotenfrequenz: 36,7 %; beobachtete Heterozygotenfrequenz: 48,1 %). Da folglich nicht ausgeschlossen werden kann, dass die erhöhte Heterozygotenfrequenz von SNP rs10518142 durch mögliche Genotypisierungsfehler bedingt ist, wurde rs10518142 von weiteren Analysen ausgeschlossen. Die Genotyp- und Allelfrequenzen der restlichen SNPs entsprachen alle dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p > 0,05$) und deckten sich mit den Referenzangaben der dbSNP.

Ergebnisse

Tabelle 21: Genotyp- und Allelfrequenzen der untersuchten SNPs in dem *CNR1*, in der *NAAA* sowie in der *MGLL* sowie Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in den Indexpatienten der Adipositaestrios

Gen ¹	SNP	Allele ²	Lokalisation	N ³	Genotypen (%)	Allelfrequenz	HWG p-Wert
<i>CNR1</i>	rs9353527	-25.046A/G	Putativer Promoter	354	A/A 165 (46,61) A/G 154 (43,50) G/G 35 (9,89)	A: 0,684 G: 0,316	0,91
<i>CNR1</i>	rs754387	-23.866C/A	Putativer Promoter	354	C/C 164 (46,33) C/A 158 (44,63) A/A 32 (9,04)	C: 0,686 A: 0,314	0,49
<i>CNR1</i>	rs6454676	-22.462G/A	Putativer Promoter	357	G/G 288 (80,67) G/A 66 (18,49) A/A 3 (0,84)	G: 0,899 A: 0,101	0,71
<i>CNR1</i>	rs806379	-6.274A/T	Intron 2	363	A/A 111 (30,58) A/T 174 (47,93) T/T 78 (21,49)	A: 0,545 T: 0,455	0,53
<i>CNR1</i>	rs1535255	-6.215T/G	Intron 2	363	T/T 256 (70,52) T/G 95 (26,17) G/G 12 (3,31)	T: 0,836 G: 0,164	0,39
<i>CNR1</i>	rs2023239	-5.489T/C	Exon 3	363	T/T 256 (70,52) T/C 95 (26,17) C/C 12 (3,31)	T: 0,836 C: 0,164	0,39
<i>CNR1</i>	rs806370	-1.338C/T	Intron 3	348	C/C 259 (74,42) C/T 84 (24,14) T/T 5 (1,44)	C: 0,855 T: 0,135	0,54
<i>CNR1</i>	rs1049353	1.359G/A	Exon 4 (kodierend)	358	G/G 197 (55,03) G/A 129 (36,03) A/A 32 (8,94)	G: 0,730 A: 0,270	0,11
<i>NAAA</i>	rs2292534	386G/A	Intron 1	355	G/G 185 (52,11) G/A 145 (40,85) A/A 25 (7,04)	G: 0,725 A: 0,275	0,64
<i>NAAA</i>	rs4859567	9.263A/T	Intron 3	354	T/T 187 (52,82) T/A 140 (39,55) A/A 27 (7,63)	T: 0,726 A: 0,274	0,91
<i>NAAA</i>	rs10518142	19.229G/T	Intron 5	352	G/G 167 (47,44) G/T 151 (42,90) T/T 34 (9,66)	G: 0,689 T: 0,311	0,99
<i>NAAA</i>	rs6819442	22.995C/T	Intron 9	352	C/C 180 (51,13) C/T 134 (38,07) T/T 38 (10,80)	C: 0,702 T: 0,298	0,09
<i>MGLL</i>	rs874546	19.608T/C	Intron 4	352	T/T 246 (69,89) T/C 93 (26,42) C/C 13 (3,69)	T: 0,831 C: 0,169	0,26
<i>MGLL</i>	rs893294	121.143T/A	Intron 8	359	T/T 190 (52,92) T/A 137 (38,16) A/A 32 (8,92)	T: 0,720 A: 0,280	0,31
<i>MGLL</i>	rs782444	148.079G/A	Exon 11	359	G/G 121 (33,70) G/A 166 (46,24) A/A 72 (20,06)	G: 0,831 A: 0,169	0,27

¹ *CNR1*: Cannabinoidrezeptor 1; *NAAA*: N-Azylethanolamin-hydrolysierende Acid Amidase; *MGLL*: Monoglyceridlipase; ² Bezeichnung der Allele bezieht sich auf die Angaben der dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP); Die Zahl entspricht der Entfernung in Nukleotiden vom A-Allel des Translationsstart (ATG); ³ Anzahl der untersuchten Indexpatienten der Adipositaestrios

Ergebnisse

Tabelle 22: Genotyp- und Allelfrequenzen der untersuchten SNPs in dem *CNR1*, in der *NAAA* sowie in der *MGLL* sowie Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in den Eltern der Adipositaestrios

Gen ¹	SNP	Allele ²	Lokalisation	N ³	Genotypen (%)	Allelfrequenz	HWG p-Wert
<i>CNR1</i>	rs9353527	-25.046A/G	Putativer Promoter	708	A/A 344 (48,59) A/G 290 (40,96) G/G 74 (10,45)	A: 0,690 G: 0,310	0,27
<i>CNR1</i>	rs754387	-23.866C/A	Putativer Promoter	710	C/C 358 (50,43) C/A 278 (39,15) A/A 74 (10,42)	C: 0,700 A: 0,300	0,07
<i>CNR1</i>	rs6454676	-22.462G/A	Putativer Promoter	714	G/G 588 (82,35) G/A 118 (16,53) A/A 8 (01,12)	G: 0,906 A: 0,094	0,45
<i>CNR1</i>	rs806379	-6.274A/T	Intron 2	726	A/A 209 (28,79) A/T 360 (49,59) T/T 157 (21,62)	A: 0,536 T: 0,464	0,93
<i>CNR1</i>	rs1535255	-6.215T/G	Intron 2	726	T/T 515 (70,94) T/G 192 (26,45) G/G 19 (02,61)	T: 0,842 G: 0,158	0,83
<i>CNR1</i>	rs2023239	-5.489T/C	Exon 3	726	T/T 513 (70,66) T/C 194 (26,72) C/C 19 (02,62)	T: 0,840 C: 0,160	0,90
<i>CNR1</i>	rs806370	-1.338C/T	Intron 3	698	C/C 525 (75,22) C/T 163 (23,35) T/T 10 (01,43)	C: 0,869 T: 0,131	0,51
<i>CNR1</i>	rs1049353	1.359G/A	Exon 4 (kodierend)	716	G/G 402 (56,14) G/A 268 (37,43) A/A 46 (06,43)	G: 0,749 A: 0,251	0,88
<i>NAAA</i>	rs2292534	386G/A	Intron 1	705	G/G 387 (54,89) G/A 262 (37,16) A/A 56 (07,95)	G: 0,735 A: 0,265	0,22
<i>NAAA</i>	rs4859567	9.263A/T	Intron 3	695	T/T 376 (54,10) T/A 280 (40,29) A/A 39 (05,61)	T: 0,742 A: 0,258	0,16
<i>NAAA</i>	rs10518142	19.229G/T	Intron 5	709	G/G 319 (44,99) G/T 341 (48,10) T/T 49 (06,91)	G: 0,690 T: 0,310	0,001
<i>NAAA</i>	rs6819442	22.995C/T	Intron 9	709	C/C 311 (43,86) C/T 333 (46,97) T/T 65 (09,17)	C: 0,674 T: 0,326	0,07
<i>MGLL</i>	rs874546	19.608T/C	Intron 4	705	T/T 475 (67,38) T/C 208 (29,50) C/C 22 (03,12)	T: 0,821 C: 0,179	0,89
<i>MGLL</i>	rs893294	121.143T/A	Intron 8	705	T/T 376 (53,33) T/A 278 (39,43) A/A 51 (07,24)	T: 0,731 A: 0,269	0,97
<i>MGLL</i>	rs782444	148.079G/A	Exon 11	705	G/G 227 (32,20) G/A 340 (48,23) A/A 138 (19,57)	G: 0,563 A: 0,437	

¹ *CNR1*: Cannabinoidrezeptor 1; *NAAA*: N-Azylethanolamin-hydrolysierende Acid Amidase; *MGLL*: Monoglyceridlipase; ² Bezeichnung der Allele bezieht sich auf die Angaben der dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP); ³ Anzahl der untersuchten Elternteile der Adipositaestrios

Ergebnisse

Der Test auf Assoziation mit frühmanifestem (extremem) Adipositas erfolgte, wie unter 3.12.6 beschrieben, in den Adipositasstrios mittels des Transmissions-Disequilibrium-Tests (TDT). Dazu wurde für jeden Indexpatienten die Transmission bzw. Nicht-Transmission der einzelnen Allele in eine Vier-Felder-Tafel eingetragen. Anschließend wurde die mögliche Assoziation über die Berechnung des χ^2 -Wertes und anschließender Ermittlung des zweiseitigen p-Wertes bestimmt, wobei ein nominales Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angenommen wurde. Die Ergebnisse des TDT für die untersuchten SNPs sind in Tab. 23 gezeigt. Für keinen der untersuchten SNPs konnte eine Assoziation mit frühmanifestem (extremem) Adipositas festgestellt werden; alle SNPs zeigten nominale zweiseitige p-Werte größer als 0,05 (Tab. 23).

Tabelle 23: Ergebnisse des TDT für die untersuchten SNPs im *CNR1*, in der *NAAA* sowie der *MGLL* in den Adipositasstrios

Gen ¹	SNP	Allele ²	Transmittiert	Nicht-Transmittiert	Transmissionsrate ³	χ^2	TDT p-Wert ⁴
<i>CNR1</i>	rs9353527	A/G	143 (G)	138 (G)	0,51 (G)	0,09	0,77
<i>CNR1</i>	rs754387	C/A	144 (A)	130 (A)	0,53 (A)	0,72	0,40
<i>CNR1</i>	rs6454676	G/A	63 (A)	55 (A)	0,53 (A)	0,54	0,46
<i>CNR1</i>	rs806379	A/T	187 (A)	173 (A)	0,52 (A)	0,54	0,46
<i>CNR1</i>	rs1535255	T/G	100 (G)	92 (G)	0,52 (G)	0,33	0,56
<i>CNR1</i>	rs2023239	T/C	100 (C)	94 (C)	0,52 (C)	0,19	0,67
<i>CNR1</i>	rs806370	C/T	80 (T)	78 (T)	0,51 (T)	0,03	0,87
<i>CNR1</i>	rs1049353	G/A	145 (A)	120 (A)	0,55 (A)	2,36	0,12
<i>NAAA</i>	rs2292534	G/A	138 (A)	121 (A)	0,53 (A)	1,12	0,29
<i>NAAA</i>	rs4859567	T/A	140 (A)	122 (A)	0,53 (A)	1,24	0,27
<i>NAAA</i>	rs6819442	C/T	179 (C)	146 (C)	0,55 (C)	3,35	0,07
<i>MGLL</i>	rs874546	T/C	107 (T)	95 (T)	0,53 (T)	0,71	0,40
<i>MGLL</i>	rs893294	T/A	144 (A)	131 (A)	0,52 (A)	0,62	0,43
<i>MGLL</i>	rs782444	G/A	175 (G)	159 (G)	0,52 (G)	0,77	0,38

¹ *CNR1*: Cannabinoidrezeptor 1; *NAAA*: N-Azylethanolamin-hydrolysierende Acid Amidase; *MGLL*: Monoglyceridlipase; ² Bezeichnung der Allele bezieht sich auf die Angaben der dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP); ³ des häufiger transmittierten Allels; ⁴ zweiseitiger nominaler p-Wert

Obwohl die beobachtete Transmissionsrate bei keinem der untersuchten SNPs signifikant von dem Erwartungswert von 50 % abwich, zeigte sich ein Trend für eine bevorzugte Transmission des *CNR1* rs1049353 A-Allels (Transmissionsrate des A-Allels: 0,55; $p = 0,12$) sowie des *NAAA* SNP rs6819442 C-Allels (Transmissionsrate des C-Allels: 0,55; $p = 0,07$). SNP rs1049353 und rs6819442 wurde deshalb in weiteren 235 Adipositasquartetten (adipöser Indexpatient, mindestens ein adipöses Geschwisterkind sowie beide biologischen Eltern)

Ergebnisse

genotypisiert (Tab. 24), wobei Abweichungen von der Gesamtanzahl von 235 Familien auf ausgefallene Genotypisierungen oder Mendelfehler zurückzuführen sind. Die erhaltenen Genotyp und Allelfrequenzen wurden auf Erfüllung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts getestet und die mögliche Assoziation mit frühmanifestem (extremem) Adipositas anhand des Pedigree-Disequilibrium-Test (PDT) untersucht.

Der initiale Trend für eine bevorzugte Transmission des *CNR1* rs1049353 A-Allels konnte durch die weitere Genotypisierung von 235 Adipositasquartetten nicht bestätigt werden; das A-Allel zeigte eine Transmissionsrate von 0,47 ($p = 0,15$; Tab. 24). Die Analyse des *NAAA* SNP rs6819442 in 235 unabhängigen Adipositasfamilien zeigte ebenfalls keine signifikante Assoziation des rs6819442 C-Allels mit frühmanifestem (extremem) Adipositas ($p = 0,19$; Tab. 24). Zu beachten ist dabei jedoch, dass auch in den Quartetten das C-Allel häufiger transmittiert wurde (Transmissionsrate des C-Allels: 0,51). Eine abschließende Analyse, bei der die Trios und Quartette zusammengefasst wurden, ergab bezüglich des *CNR1* SNP rs1049353 eine Transmissionsrate des A-Allels von 0,49 ($p = 0,567$) und bezüglich des rs6819442 C-Allels von 0,51 ($p = 0,022$; Tab. 25). Durch die zusammenfassende Analyse der Trios und Quartette ergab sich demnach eine nominale Assoziation des rs6819442 C-Allels mit frühmanifestem (extremem) Adipositas. Die Analyse des *NAAA* Transkripts mittels des Programms fastSNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw>) zeigte weiterhin, dass durch das rs6819442 C-Allel eine Bindestelle für den 'Exon-Splice-Enhancer' (ESE) SC35 wegfällt.

Tabelle 24: Genotyp und Allelfrequenz des *CNR1* SNP rs1049353 sowie des *NAAA* SNP rs6819442 in 235 Adipositasquartetten

Gen ¹	SNP	Kollektiv	N	Genotypen (%)	Allelfrequenz	HWG p-Wert	Transm. -rate ²	PDT p-Wert ³
<i>CNR1</i>	rs1049353	Kinder	488	G/G 275 (56,35) G/A 181 (37,09) A/A 32 (06,56)	G: 0,749 A: 0,251	0,76	0,47 (A)	0,15
<i>CNR1</i>	rs1049353	Eltern	460	G/G 253 (55,00) G/A 168 (36,52) A/A 39 (08,48)	G: 0,733 A: 0,267	0,15		
<i>NAAA</i>	rs6819442	Kinder	497	C/C 248 (49,90) C/T 198 (39,84) T/T 51 (10,26)	C: 0,698 T: 0,302	0,22	0,51 (C)	0,19
<i>NAAA</i>	rs6819442	Eltern	468	C/C 213 (45,51) C/T 216 (46,15) T/T 39 (08,34)	C: 686 T: 314	0,12		

¹ *CNR1*: Cannabinoidrezeptor 1; *NAAA*: N-Azylethanolamin-hydrolysierende Acid Amidase

² Transmissionsrate. Das betreffende Allel ist in Klammern angegeben; ³ zweiseitiger, nominaler p-Wert

Ergebnisse

Tabelle 25: Zusammenfassende Analyse des *CNR1* SNP rs1049353 sowie des *NAAA* SNP rs6819442 in 368 Adipositastrios und 235 Adipositasquartetten

Gen ¹	SNP	N ²	Genotypen (%)	Allelfrequenz	Transmissionsrate ³	PDT p-Wert ⁴
<i>CNR1</i>	rs1049353	846	G/G 472 (55,79) G/A 310 (36,64) A/A 64 (07,57)	G: 0,741 A: 0,259	0,49 (A)	0,567
<i>NAAA</i>	rs6819442	849	C/C 428 (50,41) C/T 332 (39,11) T/T 89 (10,48)	C: 0,700 T: 0,300	0,51 (C)	0,022

¹ *CNR1*: Cannabinoidrezeptor 1; *NAAA*: N-Azylethanolamin-hydrolysierende Acid Amidase; ² alle Kinder bzw. Jugendliche der Trios und Quartette; ³ des häufiger transmittierten Allels; ⁴ zweiseitiger nominaler p-Wert

Zur graphischen Darstellung der LD-Strukturen zwischen den analysierten SNPs wurde für jedes der untersuchten Gene anhand der erhaltenen Genotypdaten mittels des Programms HaploView 4.0 LD-Blöcke berechnet. Die erhaltenen LD-Strukturen sind in Abb. 11 dargestellt, wobei die LD-Blöcke anhand des Algorithmus 'Solid Spine of LD' berechnet wurden. Während weder in der *NAAA* noch in der *MGLL* ein Kopplungsungleichgewicht zwischen den untersuchten SNPs festgestellt wurde (Abb 11), konnten im *CNR1* mittels HaploView zwei LD-Blöcke identifiziert werden. Der erste Block besteht aus den SNPs rs9353527 und rs754387 ($r^2 = 0,98$), der zweite Block besteht aus den SNPs rs6454676, rs806379, rs1535255 und rs2023239 ($r^2 = 0,1 - 0,98$) und enthält den von Zhang et al (2004) beschriebenen TGC-Haplotyp, der aus den niederfrequenten Allelen von rs806379 (T-Allel), rs1535255 (G-Allel) und rs2023239 (C-Allel) gebildet wird und sowohl bei europäisch- wie auch bei afrikanischstämmigen Amerikanern mit multiplen Drogenmissbrauch assoziiert ist (Zhang et al. 2004). Die Analyse des TGC-Haplotyps zeigte jedoch keinen Hinweis auf eine Assoziation mit frühmanifestem (extremem) Adipositas ($p = 0,66$; Tab. 26).

Tabelle 26: Haplotyp-Analyse im *CNR1*. Der TGC-Haplotyp ist grau markiert.

SNP			Tranmittiert	Nicht- Transmittiert	Transmissions- rate	X ²	p-Wert
rs806379	rs1535255	rs2023239					
A	T	T	187	173	0,52	0,54	0,46
T	T	T	139	159	0,47	1,34	0,25
T	G	C	98	92	0,52	0,19	0,66
T	G	T	1	0	/	/	/
T	T	C	0	2	/	/	/
A	T	C	1	0	/	/	/

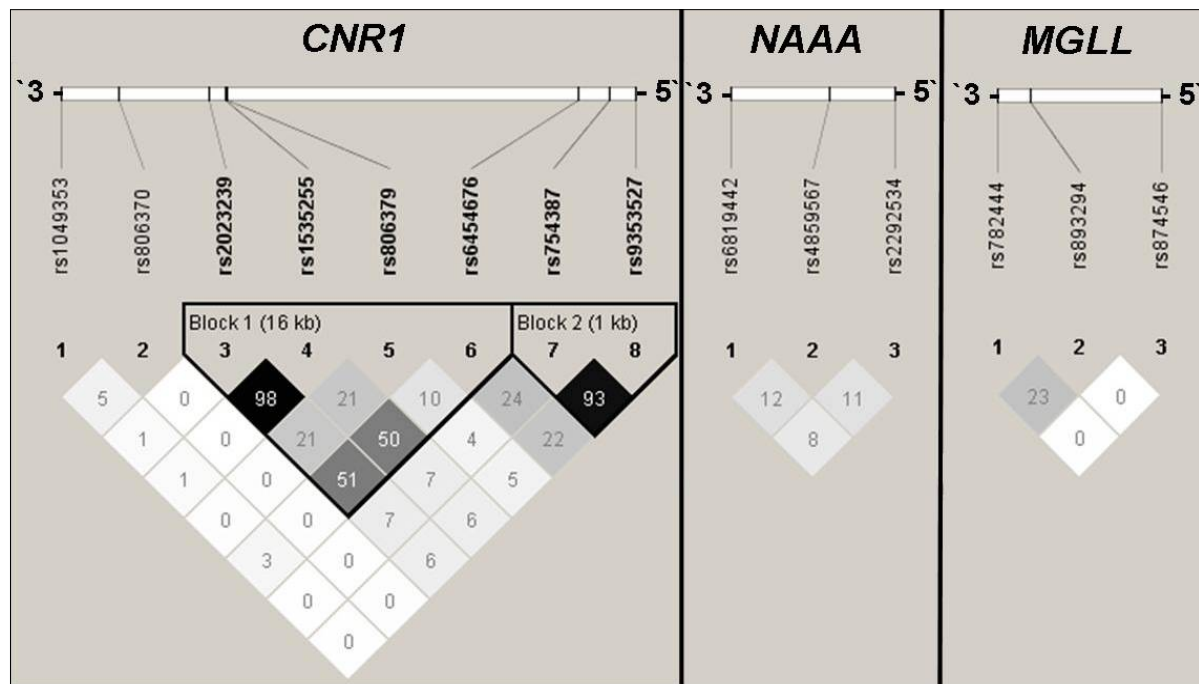


Abbildung 11: LD-Struktur der untersuchten SNPs im *CNR1*, in der *NAAA* sowie der *MGLL* basierend auf den in durch die Genotypisierung erhaltenen Genotypfrequenzen. Die Quadrate in der Schnittfläche zweier SNPs geben die Stärke des LD zwischen diesen SNPs an. Die Stärke des LD wird durch Graustufen angezeigt; schwarz=starkes LD; dunkelgrau = mittelstarkes LD; hellgrau = schwaches LD; weiss = kein LD. Die Zahlen in den Quadraten geben den r^2 -Wert in Prozent an (100 = komplettes LD; 0 = kein LD). Die Graphik wurde mit HaploView 4.0 erstellt.

4.1.2 Mutationsscreen in der kodierenden Region vom *CNR1*

Die Auswahl der Indexpatienten für den Mutationsscreen

Um bislang unbekannte bzw. 'private' (seltene) Mutationen zu identifizieren, wurde parallel zur Analyse der in Tab. 4 genannten SNPs ein Mutationsscreen in der kodierenden Region vom *CNR1* durchgeführt. Für den Mutationsscreen wurden 120 Indexpatienten der Adipositastrios ausgewählt, welche bevorzugt zu der initial beobachteten vermehrten Transmission des rs1049353 A-Allels beitrugen. Das Kollektiv setzte sich wie folgt zusammen:

- 19 homozygote Indexpatienten (A/A), die das A-Allel von ihren heterozygoten Eltern erben. Das A-Allel wurde also zweimal transmittiert und keinmal nicht-transmittiert.
- 9 homozygote Indexpatienten (A/A), welche ein A-Allel von einem heterozygoten Elternteil erben und das andere A-Allel von einem homozygoten Elternteil (A/A). Da beim TDT nur heterozygote Elternteile berücksichtigt werden, wurde das A-Allel von diesen somit einmal transmittiert und keinmal nicht-transmittiert.

- 92 heterozygote Indexpatienten (A/G), welche das A-Allel von einem heterozygoten Elternteil bekamen, während das andere Elternteil homozygot für das G-Allel war. Das A-Allel wurde also ebenfalls einmal transmittiert und keinmal nicht-transmittiert.

Das zu untersuchende Kollektiv enthielt somit 28 Homozygote für das rs1049353 A-Allel sowie 92 Heterozygote für das rs1049353 A-Allel. SNP rs1049353 befindet sich in dem zu screenenden Fragment fünf. Die 28 homozygoten Indexpatienten sollten demnach in dem Mutationsscreen eindeutig von den heterozygoten zu unterscheiden sein und somit als interne Kontrolle für die Spezifität der SSCP dienen.

Ergebnis des Mutationsscreens

Für den Mutationsscreen wurde der kodierende Bereich von *CNR1* (wie unter 3.10 beschrieben) in fünf überlappende Fragmente geteilt (siehe Anhang 8.2). Alle fünf Fragmente wurden, wie beschrieben, bei verschiedenen Temperaturen mittels SSCP oder dHPLC untersucht. In den Fragmenten eins bis vier zeigten sich keinerlei auffällige Proben. Ein Abgleich mit der Sequenzangabe der Datenbank 'Ensembl' bestätigte, dass in diesem Bereich keinerlei beschriebene genetische Varianten liegen. In Fragment fünf, welches das 3' Ende der kodierenden Region umfasste, konnten mittels SSCP insgesamt drei verschiedene Varianten mit unterschiedlicher Häufigkeit detektiert werden (Tab. 27, Abb. 12). Zur besseren Übersicht werden die drei Varianten nachfolgend mit der Nr. 1, 2 und 3 bezeichnet. Der Abgleich mit der Datenbank 'Ensembl' zeigte dabei, dass in diesem Fragment nur ein SNP (rs1049353) zu erwarten war.

Tabelle 27: Ergebnisse des Mutationsscreens mittels SSCP und dHPLC

Fragment	Methode ¹	Verwendeten Temperaturen	Variante Nr.	Häufigkeit der Variante
1	SSCP	RT / 4°C	/	/
2	dHPLC	60 / 61 / 64°C	/	/
3	dHPLC	60 / 62 / 64°C	/	/
4	SSCP	RT / 4°C	/	/
5	SSCP	RT / 4°C	1	92 / 28 ²
			2	1
			3	1

¹ SSCP: Einzelstrang-Konformations-Analyse, dHPLC: denaturing High Performance Liquid Chromatography; ² die Variante wurde 92-mal im heterozygoten Zustand und 28-mal im homozygoten Zustand detektiert

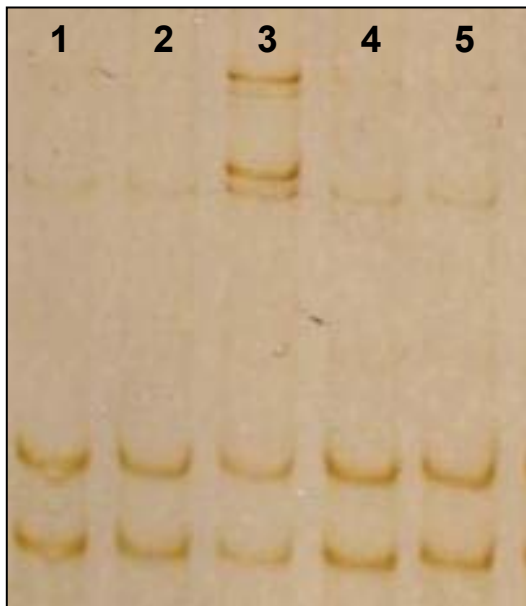


Abbildung 12: SSCP-Gel für *CNR1*
Fragment 5 mit auffälligem
Bandenmuster an Position 3

Charakterisierung der detektierten Sequenzvarianten im CNR1

Um die mittels SSCP detektierten Sequenzvarianten genau zu charakterisieren, wurden einige ausgewählte auffällige Proben zusammen mit zwei unauffälligen Proben (wie unter 3.11 beschrieben) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit den Sequenzangaben der dbSNP verglichen (Abb. 13).

Durch die Sequenzierung konnten insgesamt drei verschiedene Sequenzvarianten identifiziert werden (Abb. 13). Variante Nr. 1, die in allen Personen vorkam, entsprach SNP rs1049353, wobei 92 Personen heterozygot für diese Variante waren (Abb. 13A), während 28 Personen homozygot für das rs1049353 A-Allel waren (Abb. 13B). Ein Abgleich mit den durch die MALDI-TOF Massenspektrometrie erhaltenen Genotypen zeigte, dass alle 28 Homozygoten für das rs1049353 A-Allel mittels SSCP identifiziert werden konnten, woraus sich eine Spezifität der SSCP von 100 % ergab. Variante Nr. 2 (Abb. 13C) wurde bei einem der Probanden identifiziert und basierte auf dem Austausch der Base Adenin durch ein Cytosin in Nukleotid 1256 nach dem Translationssstart (c.1256C/A). In dem CNR1 Protein ergibt sich dadurch der nicht-synonyme, nicht-konservative Austausch der Aminosäure Alanin durch ein Glutamat an der Stelle 419 des Proteins (Ala419Glu). Der betreffende Indexpatient war heterozygot für diese Variante. Variante Nr. 3 (Abb. 13D) betraf das erste Nukleotid nach der kodierenden Region von *CNR1* und führte zum Austausch der Base Guanin gegen ein Cytosin (1419+1G/C). Die betreffende Indexpatientin war

ebenfalls heterozygot für diese Variante. Nachdem die mittels SSCP und dHPLC detektierten Sequenzvarianten durch Sequenzierung charakterisiert wurden, erfolgte die Bestätigung der neu identifizierten Varianten mittels PCR-RFLP, wobei neben den betreffenden Indexpatienten auch deren Eltern genotypisiert wurden. Beide neu identifizierten Varianten konnten dabei durch die PCR-RFLP bestätigt werden; der heterozygote Träger der c.1256C/A Mutation erhielt das seltene A-Allel von seinem für diese Mutation heterozygoten Vater; die heterozygote Trägerin der 1419+1G/C Mutation erhielt das seltene C-Allel von ihrem ebenfalls für diese Mutation heterozygoten Vater. Die deskriptive Statistik der Mutationsträger ist in Tab. 26 dargestellt. Zu beachten ist dabei, dass die für die Mutation heterozygoten Elternteile weniger adipös sind als die Elternteile, welche die Mutation nicht tragen (Tab. 28).

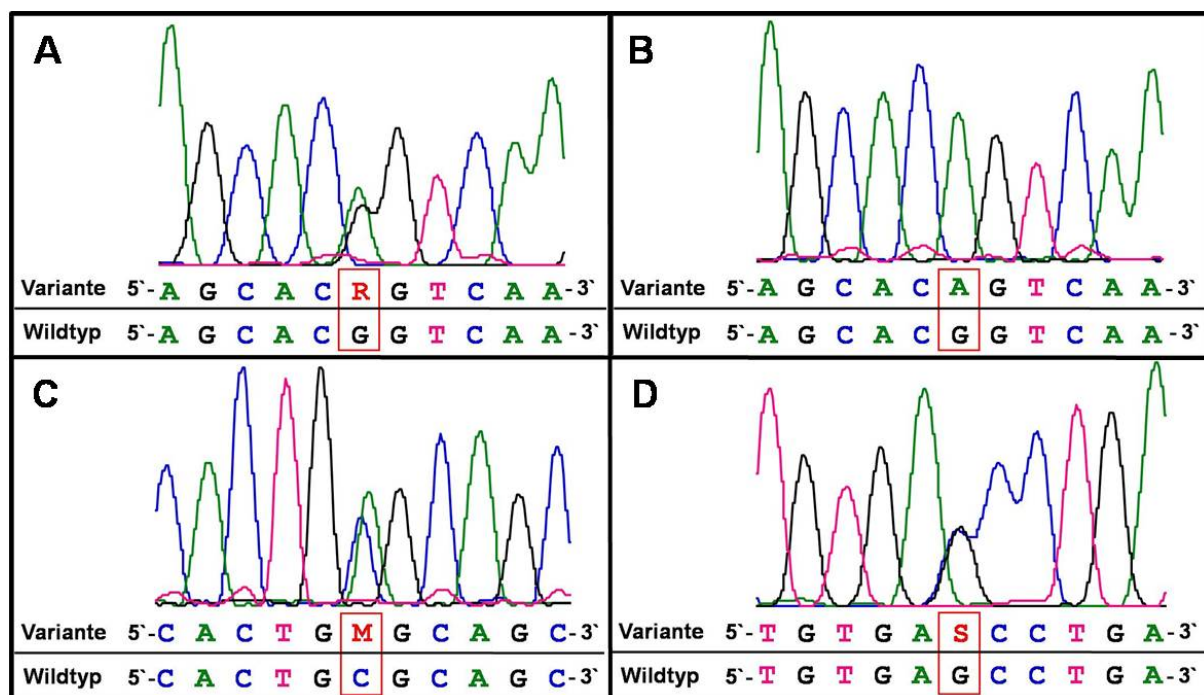


Abbildung 13: Ergebnis der Sequenzierung der mittels SSCP im *CNR1* detektierten Varianten. Dargestellt ist jeweils der Bereich von fünf Nukleotiden 5' und 3' um die identifizierte Variante. Darunter ist die Referenzsequenz nach Angaben der dbSNP angegeben (Wildtyp). Der Bereich der Variante ist mit einem roten Kästchen markiert. Der Buchstabe 'M' kennzeichnet den Austausch der Base Cytosin gegen ein Adenin, der Buchstabe 'R' kennzeichnet den Austausch der Base Guanin gegen ein Adenin und der Buchstabe 'S' kennzeichnet den Austausch der Base Guanin gegen ein Cytosin. A) Sequenz eines Probanden, der heterozygot für das rs1049353 A-Allel ist; B) Sequenz eines Probanden, der homozygot für das rs1049353 A-Allel ist; C) Sequenz des Probanden, der heterozygot für die c.1256C/A Variante ist; D) Sequenz der Probandin, die heterozygot für die 1419+1G/C Variante ist.

Tabelle 28: Deskriptive Statistik der Familien, welche die neu identifizierte c.1256C/A bzw. die 1419+1G/C Variante im *CNR1* tragen

Variable	c.1256C/A (Ala419Glu)			1419+1G/C		
	Indexpatient	Mutter	Vater	Indexpatient	Mutter	Vater
Geschlecht	männlich	weiblich	männlich	weiblich	weiblich	männlich
Alter (Jahre)	11,23	46,87	51,12	14,48	55,06	54,73
BMI (kg/m ²)	26,49	35,38	28,90	34,95	33,79	31,28
BMI-Perzentile	99	99	87	100	97	94
Genotyp	CA	CC	CA	GC	GG	GC

Funktionelle Charakterisierung der c.1256C/A (Ala419Glu) Variante und Proteinalignment

Da die mittels SSCP detektierte c.1256C/A Variante zu einem nicht-synonymen, nicht-konservativen Austausch der Aminosäure Alanin gegen ein Glutamat an der Stelle 419 des Proteins führt (Ala419Glu), wurde von Kooperationspartnern in funktionellen *in-vitro* Studien weiter untersucht, ob dieser Aminosäureaustausch zu einer veränderten Funktion von *CNR1* führt. Die funktionellen Studien wurden von Prof. Dr. Thue W. Schwartz am Panum Institut der Universität Kopenhagen, Dänemark, durchgeführt. Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass die konstitutive Aktivität von *CNR1* bei der 419Glu Variante gegenüber dem Wildtyp (419Ala) um ca. 100 % erhöht ist; während bei der wildtypischen 419Ala Variante ohne Ligandenbindung eine Rezeptoraktivität von 35 – 40 % detektiert wurde, zeigte die 419Glu Variante ohne Ligandenbindung eine Rezeptoraktivität von 75 – 80 %.

Die weitere Analyse des *CNR1* Transkripts mittels des Programm fastSNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw>) zeigte außerdem, dass bei der 419Glu Variante gegenüber der 419Ala Variante Sequenzmotive für ESE (Exon-Splice-Enhancer) Proteine verändert werden (bei der 419Glu Variante fallen Bindestellen für die Splice Faktoren Srp55 und Srp40 weg und es kommt eine Bindestelle für den Splice faktor SF2/ASF hinzu), wodurch es möglich ist, dass die Variante zu einem alternativen Splicen des *CNR1* Transkripts führt. Ein Vergleich der Proteinsequenz verschiedener Spezies (u.a. Mensch, Maus, Huhn, Frosch, Fisch) mittels des Programms PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) zeigte jedoch, dass die wildtypische *CNR1* 419Ala Variante innerhalb dieser Spezies hoch konserviert ist, was nicht auf eine generelle Relevanz der 419Glu Variante in der Ätiologie der Adipositas hindeutet.

4.2 Das *FTO* ('fat mass and obesity associated') Gen

4.2.1 Assoziation von rs9939609 mit frühmanifestem (extremem) Adipositas

Initial wurde der intronische *FTO* SNP rs9939609, wie beschrieben, in 519 deutschen (extrem) adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 178 erwachsenen normalgewichtigen Kontrollen mittels ARMS-PCR genotypisiert. Die erhaltenen Genotyp- und Allelfrequenzen sind in Tab. 29 dargestellt. Wie aus früheren Studien erwartet wurde, war die Frequenz des A-Allels in den Fällen größer als in den Kontrollen (0,5 gegen 0,44, Tab. 29). Der Abgleich mit der dbSNP zeigte, dass die erhaltenen Genotyp- und Allelfrequenzen für die Kontrollgruppe mit den Datenbankangaben für die europäische Population (HapMap CEU) in Einklang sind. Zu beachten ist allerdings, dass in der Gruppe der adipösen Indexpatienten (Fälle) ein Trend für eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht festgestellt wurde ($p = 0,065$; Tab. 29). Um auszuschließen, dass dieser Trend auf Genotypisierungsfehler zurückzuführen ist, wurde SNP rs9939609 zusätzlich in 34 Personen der in 1.5.2 beschriebenen GWA für frühmanifeste (extreme) Adipositas (Hinney et al. 2007) mittels ARMS-PCR genotypisiert. Die erhaltenen Genotypen stimmten zu 100 % mit den GWA-Daten überein, was den Schluss zulässt, dass die ARMS-PCR eine valide Methode zur Genotypisierung von rs9939609 darstellt. Der beobachtete Trend für eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in den Fällen ist somit mutmaßlich dadurch zu erklären, dass die Gruppe der adipösen Indexpatienten mit dem potentiell zu Adipositas prädisponierenden Risikoallel (A-Allel) angereichert ist (Frequenz des A-Allels in den Fällen 50 % gegen 44 % bei den Kontrollen, Tab. 29), was den Effekt dieser Variante untermauert.

Tabelle 29: Genotyp- und Allelfrequenzen des *FTO* SNP rs9939609 bei 519 deutschen adipösen Kindern und Jugendlichen (Fälle) sowie 178 erwachsenen, normalgewichtigen Kontrollen

	Genotyp N (%)			Allele (%)		HWG ¹
	TT	AT	AA	T	A	p-Wert
Fälle	140 (27)	238 (46)	141 (27)	0,50	0,50	0,065
Kontrollen	56 (31)	86 (48)	36 (20)	0,56	0,44	0,763

¹ HWG: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Ergebnisse

Eine Powerkalkulation mittels des Programms Quanto V.1.2.3 (<http://hydra.usc.edu/gxe/>) ergab, dass die Kollektivgröße von 519 Fällen und 178 Kontrollen (unter Annahme einer Frequenz des selteneren Allels von mindestens 0,4 sowie einem einseitigen Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$) eine geschätzte Power von mindestens 95 % hat, um ein relatives Risiko von 1,5 zu detektieren.

Die erhaltene Genotypverteilung wurde, wie von Frayling et al. (2007) vorgeschlagen, unter Annahme eines log-additiven Vererbungsmodells ausgewertet, wobei aufgrund der zu überprüfenden Alternativhypothese (das rs9939609 A-Allel ist mit Adipositas assoziiert) nominal einseitige p-Werte berechnet wurden. Das Ergebnis ist in Tab. 30 gezeigt, wobei die Assoziation des rs9939609 A-Allels mit frühmanifestester (extremer) Adipositas bestätigt wurde (OR_{AT} : 1,24, 95 % CI: 0,98 - 1,57; OR_{AA} : 1,54, 95 % CI: 0,96 - 2,46; $p = 0,036$). Die Heterozygoten für das rs9939609 A-Allel zeigten also ein 1,24-fach erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Adipositas, während bei den homozygoten Trägern des A-Allels ein 1,54-fach erhöhtes Risiko beobachtet wurde (Tab. 30).

Tabelle 30: Ergebnis der Assoziationsstudie des *FTO* SNP rs9939609 mit Adipositas bei 519 deutschen adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 178 erwachsenen, normalgewichtigen Kontrollen

	Genotyp			p-Wert ²
	TT	AT	AA	
Odds Ratio (OR)	1	1,24	1,54	0,036
95% CI ¹		0,98....1,57	0,96....2,46	

¹ CI = Konfidenzintervall; ² einseitiger nominaler p-Wert

Um die Aussagekraft der Kontrollgruppe zu erhöhen, wurden in einer zweiten Assoziationsstudie die 178 normalgewichtigen Kontrollen mit den bereits in der GWA für frühmanifesteste (extreme) Adipositas (Hinney et al. 2007) verwendeten 442 untergewichtigen Kontrollen gemeinsam analysiert (Tab. 31). Dabei konnte die Assoziation des rs9939609 A-Allels mit frühmanifestester (extremer) Adipositas erneut bestätigt werden ($p_{\text{nominal}} = 0,0000057$, OR_{AT} : 1,47, 95 % CI: 1,24 - 1,73; OR_{AA} : 2,15, 95 % CI: 1,54 - 2,98; Tab. 31). Gegenüber den Homozygoten für das T-Allel zeigten die Homozygoten für das A-Allel ein 2,15-fach erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Adipositas (die Heterozygoten für das A-Allel ein 1,47-fach erhöhtes Risiko).

Ergebnisse

Tabelle 31: Ergebnis der Assoziationsstudie des *FTO* SNP rs9939609 mit Adipositas bei 519 deutschen adipösen Kinder und Jugendlichen sowie 620 erwachsenen normal- und untergewichtigen Kontrollen

	Genotyp			p-Wert ²
	TT	AT	AA	
Odds Ratio	1	1,47	2,15	0,0000057
95% CI ¹		1.24....1,73	1.54....2,98	

¹ CI = Konfidenzintervall; ² einseitiger nominaler p-Wert

4.2.2 Assoziation des rs9939609 Genotyps mit der Gewichtsreduktion nach einer einjährigen Adipositas-Interventionstherapie

Von den initial untersuchten 519 deutschen adipösen Kindern und Jugendlichen nahmen 207 Individuen an dem einjährigen Adipositas-Interventionsprogramm 'Obeldicks' an der Vestischen Kinderklinik Datteln teil. Der BMI dieser Kinder und Jugendlichen wurde zu Beginn sowie 10 - 12 Monate nach Beginn der Therapie gemessen. Die BMI-Werte wurden in BMI-SDS Werte umgerechnet und die Differenz aus beiden Werten bestimmt (Δ BMI-SDS). Die Genotypverteilung sowie die ermittelten Δ BMI-SDS Werte sind in Tab. 32 dargestellt. Da unbekannt war, ob der rs9939609 Genotyp einen Einfluss auf den Therapieerfolg hat, wurde keine zu überprüfende Hypothese zu Grunde gelegt und dementsprechend zweiseitige nominale p-Werte berechnet (Tab. 32). Obwohl die Träger des rs9939609 A-Allels durch die Gewichtsreduktionstherapie etwas weniger Gewicht verloren als homozygote Träger des T-Allels (Δ BMI-SDS: TT: $0,33 \pm 0,40$, TA: $0,25 \pm 0,27$, AA: $0,27 \pm 0,27$), konnte keine signifikante Assoziation von rs9939609 mit dem Gewichtsverlust nach der einjährigen Interventionstherapie festgestellt werden ($p=0,287$, Tab. 32). Weiterhin ist zu beachten, dass der BMI-SDS bei homozygoten Personen für das rs9939609 A-Allel zu Beginn der Interventionstherapie nicht wesentlich höher war, als bei den homozygoten Personen für das T-Allel (BMI-SDS A/A: $2,386 \pm 0,398$ gegen T/T: $2,370 \pm 0,416$). Innerhalb der untersuchten adipösen Individuen zeigte demnach der Genotyp von SNP rs9939609 keinen direkten Zusammenhang mit dem Schweregrad der Adipositas.

Ergebnisse

Tabelle 32: Genotypverteilung des *FTO* SNP rs9939609 sowie Δ BMI-SDS von den 207 adipösen Kindern und Jugendlichen, die an der einjährigen Adipositas-Interventionstherapie teilnahmen

Genotyp	N ¹ (%)	BMI-SDS ² Mittelwert \pm SD	BMI-SDS ³ Mittelwert \pm SD	Δ BMI-SDS Mittelwert \pm SD	95% CI ⁴	p-Wert ⁵
TT	53 (26)	2,370 \pm 0,416	2,037 \pm 0,604	0,33 \pm 0,40	-0,091...0,027	0,287
AT	86 (41)	2,508 \pm 0,433	2,262 \pm 0,548	0,25 \pm 0,27		
AA	68 (33)	2,386 \pm 0,398	2,114 \pm 0,449	0,27 \pm 0,27		

¹ Anzahl der untersuchten Indexpatienten mit dem entsprechenden Genotyp; ² BMI-SDS zu Beginn der Therapie; ³ BMI-SDS 10 - 12 Monate nach Beginn der Therapie; ⁴ CI = Konfidenzintervall; ⁵ zweiseitiger nominaler p-Wert

4.2.3 Assoziation des rs9939609 Genotyps mit Parametern des Glukose und Fettstoffwechsels

Von bis zu 480 der 519 adipösen Kinder und Jugendlichen waren von PD Dr. Thomas Reinehr (Vestische Kinderklinik Datteln, Universität Witten/Herdecke) bzw. Prof. Dr. Christian L. Roth (Zentrum für Kinderheilkunde, Universität Bonn) Serumwerte von Parametern des Glukose- und Fettstoffwechsels (Serumglukose, Triglyzeride, HDL- sowie LDL Cholesterin) zur Verfügung gestellt worden. Die entsprechenden Werte sind in Tab. 33 dargestellt, wobei für keinen der untersuchten Blutparameter eine Assoziation mit dem rs9939609 Genotypstatus festgestellt werden konnte (alle Parameter zeigten nominale zweiseitige p-Werte > 0,05).

Tabelle 33: Assoziation des *FTO* rs9939609 Genotypstatus mit Blutparametern des Glukose- und Fettstoffwechsels

Parameter	N ¹ gesamt	Genotyp	N (%)	Mittelwert \pm SD	Additives genetisches Modell	
					95% CI ²	p-Wert ³
TGL [mg/dl] ⁴	332	TT	94 (28)	115,15 \pm 65,17	-0,039...0,022	0,59
		AT	159 (48)	107,89 \pm 52,75		
		AA	79 (24)	109,52 \pm 53,64		
LDL [mg/dl] ⁵	323	TT	93 (29)	104,18 \pm 30,12	-0,021...0,020	0,947
		AT	153 (47)	106,52 \pm 32,67		
		AA	77 (24)	103,42 \pm 30,75		
HDL [mg/dl] ⁶	324	TT	93 (29)	50,25 \pm 11,26	-0,018...0,010	0,601
		AT	153 (47)	50,92 \pm 11,28		
		AA	78 (24)	49,33 \pm 11,54		
Glukose [mg/dl]	480	TT	136 (28)	85,54 \pm 9,09	-0,009...0,003	0,35
		AT	216 (45)	84,67 \pm 9,54		
		AA	128 (27)	84,37 \pm 8,60		

¹ Anzahl der analysierten Probanden; ² Konfidenzintervall; ³ zweiseitiger nominaler p-Wert; ⁴ TGL: Triglyzeride; ⁵ LDL: low density lipoprotein cholesterol; ⁶ HDL: high density lipoprotein cholesterol

5. Diskussion

5.1 Analyisierte Gene des Endocannabinoidsystems; *CNR1*, *NAAA* und *MGLL*

5.1.1 Assoziationsstudien in dem *CNR1*, in der *NAAA* sowie in der *MGLL*

Die Analyse von acht SNPs in dem *CNR1*, vier SNPs in der *NAAA* sowie drei SNPs in der *MGLL* bei 368 Adipositastrios erbrachten keinen Hinweis auf eine Assoziation der untersuchten SNPs mit frühmanifestester (extremer) Adipositas; alle untersuchten SNPs zeigten nominale zweiseitige p-Werte $> 0,05$. Lediglich der *CNR1* SNP rs1049353 sowie der *NAAA* SNP rs6819442 zeigten einen Trend für eine bevorzugte Transmission des rs1049353 A-Allels bzw. des rs6819442 C-Allels in den Adipositastrios (Transmissionsrate des *CNR1* rs1049353 A-Allels: 0,55; $p = 0,12$; Transmissionsrate des *NAAA* rs6819442 C-Allels 0,55, $p = 0,07$, Tab. 23). Die bevorzugte Transmission des *CNR1* rs1049353 A-Allels konnte durch die weitere Analyse dieses SNP in 235 Adipositasquartetten (siehe 4.1.1) nicht bestätigt werden (Transmissionsrate des A-Allels 0,49, $p_{\text{kombiniert}} = 0,567$, Tab. 25). Bei dem *NAAA* SNP rs6819442 zeigte sich dagegen durch die weitere Analyse dieses SNP in 235 Adipositasquartetten eine nominale Assoziation des rs6819442 C-Allels mit frühmanifestester (extremer) Adipositas (Transmissionsrate des C-Allels 0,51, $p_{\text{kombiniert}} = 0,022$, Tab. 25). Zu beachten ist dabei allerdings, dass es sich um nominale, also unkorrigierte Daten handelt und die Ergebnisse demnach rein explorativ zu bewerten sind.

Bislang wurden keinerlei Assoziationsstudien bezüglich *NAAA* veröffentlicht. Lediglich eine Assoziationsstudie untersuchte kürzlich die Assoziation genetischer Varianten (u.a. auch den in dieser Arbeit analysierten SNP rs874546) in der *MGLL* mit Alkoholmissbrauch, wobei jedoch keine Assoziation der untersuchten Varianten mit Alkoholmissbrauch festgestellt wurde (Iwasaki et al. 2007).

Im Gegensatz zu *NAAA* und *MGLL* untersuchten bereits zahlreiche Studien die mögliche Assoziation von genetischen Varianten in *CNR1* mit verschiedenen Störungen wie Drogenmissbrauch (Comings et al. 1997, Heller et al. 2001, Zhang et al. 2004, Hopfer et al. 2006, Herman et al. 2006), Alkoholmissbrauch (Schmidt et al. 2002, Preuss et al. 2003), Gilles de la Tourette Syndrom (Gadzicki et al. 1999, 2004), Schizophrenie (Leroy et al. 2001, Seifert et al. 2007, Hamdani et al. 2008) und Anorexia nervosa (Siegfried et al. 2004, Müller et al. *eingereicht*). Während des Verlaufs der vorliegenden Arbeit wurden zudem auch einige Assoziationsstudien für

Adipositas veröffentlicht (Gazzerro et al. 2007, Aberle et al. 2007, Peeters et al. 2007, Russo et al. 2007; Müller et al. 2007, Benzinou et al. 2008). Die Ergebnisse der einzelnen Studien sind kontrovers und lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Assoziation genetischer Varianten im CNR1 mit Drogen- und Alkoholmissbrauch

Im Gehirn vermittelt das Endocannabinoidsystem die durch Drogen- und Alkoholkonsum induzierten Belohnungseffekte durch eine Modulation des mesolimbischen dopaminergen Systems; der Konsum von Drogen und Alkohol stimuliert u.a. im Nukleus Akkumbens sowie der Ventral Tegmental Area (VTA) die Expression und Sekretion von Endocannabinoiden (Anandamid und 2-AG), wodurch die dopaminerge Neurotransmission in diesen Arealen stimuliert wird (u.a. Maldonado et al. 2006). Verschiedene Studien untersuchten deshalb, ob genetische Variabilität im *CNR1* mit Drogen- sowie Alkoholmissbrauch assoziiert ist.

Zhang et al. (2004) identifizierten einen Haplotyp im *CNR1*, welcher aus drei SNPs gebildet wird und sowohl bei europäisch- wie auch bei afrikanischstämmigen Amerikanern mit multiplem Drogenkonsum assoziiert ist (Zhang et al. 2004). In funktionellen Studien konnten Zhang et al. (2004) zudem zeigen, dass dieser Haplotyp im zerebralen Kortex sowie dem Mittelhirn zu einer erniedrigten Expression vom *CNR1* führt (Zhang et al. 2004). Der Haplotyp, der aus den niederfrequenten Allelen von SNP rs806379 (T-Allel), rs1535255 (G-Allel) sowie rs2023239 (C-Allel) gebildet wird (TGC-Haplotyp), zeigte jedoch in einer anderen Studie keine Assoziation mit dem Konsum von Drogen (Herman et al. 2006).

Auch der erstmals von Gadzicki et al. (1999) beschriebene SNP rs1049353, welcher auch in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde, wurde bereits auf eine mögliche Assoziation mit Drogen- (Zhang et al. 2004, Heller et al. 2001, Hopfer et al. 2006, Herman et al. 2006) und Alkoholmissbrauch (Schmidt et al. 2002, Preuss et al. 2003) untersucht. Schmidt et al. (2002) untersuchten SNP rs1049353 bei 121 deutschen Alkoholabhängigen sowie 136 Kontrollen und stellte fest, dass der A/A Genotyp mit einem erhöhten Risiko für eine Alkoholabhängigkeit assoziiert ist (Schmidt et al. 2002). Eine andere Studie konnte diesen Befund jedoch nicht bestätigen (Preuss et al. 2003). Auch Berichte über die Assoziation des rs1049353 A-Allels mit Drogenmissbrauch (Zhang et al. 2004) konnten in anderen Studien nicht bestätigt werden (Heller et al. 2001, Hopfer et al. 2006).

Assoziation genetischer Varianten im CNR1 mit dem Gilles de la Tourette Syndrom und Schizophrenie

Da einige Studien zeigen, dass der Konsum von Cannabis zu einer Reduktion der Ticks sowie des zwanghaften Verhaltens bei Patienten mit dem Gilles de la Tourette Syndrom (GTS) führt (u.a. Muller-Vahl 2003), wurde vermutet, dass genetische Variabilität im *CNR1* mit GTS assoziiert ist (Gadzicki et al. 1999, 2004). Die Assoziation genetischer Varianten (u.a. rs1049353) im *CNR1* mit GTS konnte dabei jedoch nicht gezeigt werden (Gadzicki et al. 1999, 2004). Ebenso konnte keine Assoziation von SNP rs1049353 mit Schizophrenie festgestellt werden (Seifert et al. 2007, Hamdani et al. 2008).

Assoziation genetischer Varianten im CNR1 mit für die Gewichtsregulation relevanten Phänotypen

Gazzerio et al. (2007) untersuchten SNP rs1049353 in je 70 italienischen Erwachsenen des ersten, dritten und fünften BMI-Quintils und stellten fest, dass die Frequenz des G-Allels mit steigendem BMI zunahm. Weiterhin beschrieben Gazzerio et al. (2007) eine Assoziation des G/G Genotyps mit Übergewicht und Adipositas. Peeters et al. (2007) untersuchten SNP rs1049353 in 1064 adipösen Erwachsenen sowie 251 normalgewichtigen Kontrollen und konnten, im Gegensatz zu Gazzerio, keinen Unterschied in der Frequenz des G-Allels zwischen adipösen und normalgewichtigen Personen feststellen (Peeters et al. 2007). Weiterhin zeigte sich bei Männern, nicht jedoch bei Frauen, eine Assoziation des rs1049353 A-Allels mit einem erhöhten Bauchumfang sowie einer erhöhten Waist-to-Hip Ratio (WHR), was bei Männern auf die Assoziation des rs1049353 A-Allels mit abdominaler Adipositas hindeutet (Peeters et al. 2007). Aberle et al. (2007) untersuchten die mögliche Assoziation des rs1049353 Genotypstatus mit dem Gewichtsverlauf nach einer sechswöchigen Diät bei 451 adipösen Individuen und konnte keine Assoziation zwischen dem rs1049353 Genotypstatus und dem Gewichtsverlust durch die Diät feststellen (Aberle et al. 2007). Benzinou et al. (2008) untersuchten kürzlich die Assoziation von 26 SNPs im *CNR1* (u.a. auch die in der vorliegenden Studie analysierten SNPs rs1049353, rs754387 und rs2023239) mit frühmanifesten Adipositas sowie Adipositas im Erwachsenenalter. Während SNP rs2023239 sowohl bei französischen, wie auch bei dänischen und schweizer Erwachsenen eine nominale Assoziation mit Adipositas zeigte, konnte für keinen der untersuchten SNPs

eine Assoziation mit frühmanifester Adipositas festgestellt werden (Benzinou et al. 2008).

Im Rahmen der hier durchgeführten Studien konnte ebenfalls für keinen der analysierten SNPs, noch des von Zhang et al. (2004) beschriebenen (potentiell funktionell relevanten) TGC-Haplotyp eine Assoziation mit frühmanifester (extremer) Adipositas festgestellt werden; alle untersuchten SNPs sowie der TGC-Haplotyp zeigten nominale zweiseitige p-Werte $> 0,05$ (Tab. 23; Müller et al. 2007). Durch die in dieser Studie durchgeführten Assoziationsstudien kann jedoch eine generelle Bedeutung von *CNR1*-Sequenzvarianten an der Gewichtsregulation nicht gänzlich ausgeschlossen werden. So wäre es einerseits möglich, dass andere Sequenzvarianten, welche nicht im LD mit den hier untersuchten Varianten liegen, einen quantitativen Einfluss auf das Körpergewicht haben, andererseits könnte der Effekt der untersuchten Varianten auf das Körpergewicht so klein sein, dass größere Fallzahlen nötig wären, um diese Effekte zu detektieren. Des Weiteren wäre es denkbar, dass genetische Varianten im *CNR1* zu einer reduzierten Funktion des *CNR1* führen und demzufolge eher mit Untergewicht und Anorexia nervosa, anstatt mit Übergewicht und Adipositas, assoziiert sind. Die Analyse von rs1049353, rs2023239, rs1535255, rs806379 sowie des TGC-Haplotyp bei 204 Patientinnen mit Anorexia nervosa (AN) sowie 178 normalgewichtigen Personen ergab jedoch keinen Hinweis auf eine Assoziation dieser Varianten mit AN (Müller et al., *eingereicht*).

5.1.2 Mutationsscreen in der kodierenden Region vom *CNR1*

Um bislang unbekannte bzw. 'private' (seltene) Mutationen im *CNR1* zu detektieren, wurde im Rahmen dieser Studie erstmals ein Mutationsscreen in der kodierenden Region vom *CNR1* bei adipösen Individuen durchgeführt. In dem Screen konnten dabei insgesamt drei Sequenzvarianten detektiert werden. Von den 120 untersuchten adipösen Indexpatienten waren 28 homozygot für das rs1049353 A-Allel während die restlichen 92 Indexpatienten heterozygot für dieses Allel waren. Homozygote G-Allelträger waren nicht in dem zu screenenden Kollektiv vorhanden, da für den Mutationsscreen nur Individuen ausgewählt wurden, welche zu der initial beobachteten Übertransmission des rs1049353 A-Allels beitrugen. Alle 28 Indexpatienten, die Homozygot für das rs1049353 A-Allel waren, konnten mittels SSCP detektiert werden, woraus sich eine Spezifität der SSCP von 100 % ergibt.

SNP rs1049353 (1359G/A) betrifft Kodon 453 des CNR1 Proteins und führt nicht zu einem Aminosäureaustausch (453Thr; stumme Variante, Abb. 14). Neben SNP rs1049353 konnten zwei seltene Sequenzvarianten identifiziert werden, eine c.1256C/A (Ala419Glu) Variante sowie eine 1419+1G/C Variante, welche jeweils in einem adipösen Indexpatienten im heterozygoten Zustand detektiert wurden. Beide heterozygoten Indexpatienten erhielten die seltene Variante von ihren für die jeweilige Mutation heterozygoten Vätern.

Die c.1256C/A (Ala419Glu) Variante im CNR1

Die c.1256C/A Variante, welche zu dem nicht-synonymen, nicht-konservativen Austausch der Aminosäure Alanin gegen ein Glutamat an der Stelle 419 des Proteins führt (Ala419Glu), wurde bislang noch nicht beschrieben.

CNR1 ist ein konstitutiv aktiver, aus 472 Aminosäuren (AS) bestehender, G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen. Der intrazelluläre C-terminale Teil des Rezeptors umfasst AS 401 – 472 und unterteilt sich in den proximalen (AS 401 – 417) sowie den distalen C-terminalen Bereich (AS 418 – 472) (Nie und Lewis 2001a und b, Abb. 14). Die Bindung eines CNR1 Agonisten führt über die Aktivierung von G-Proteinen zu einer Inhibition von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen, wodurch der Ca^{2+} -Strom in die Zelle sinkt (Nie und Lewis 2001a). Zu beachten ist dabei allerdings, dass die konstitutive Aktivität von CNR1 auch ohne die Bindung eines Agonisten über die Aktivierung von G-Proteinen zu einer tonischen Inhibition des intrazellulären Ca^{2+} -Stroms führt, was daran zu erkennen ist, dass die Applikation des selektiven CNR1 Antagonisten Rimonabant zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Stroms führt (Nie und Lewis 2001b). Die Bindung eines Agonisten verstärkt also gewissermaßen lediglich die Inhibition des Ca^{2+} -Stroms.

Nie und Lewis (2001a) untersuchten den intrazellulären Ca^{2+} -Strom nach Applikation eines selektiven CNR1 Agonisten und stellten fest, dass der Agonist nach Deletion des C-terminalen Bereichs (AS 401 – 472) vom CNR1 nicht mehr in der Lage ist, den intrazellulären Ca^{2+} -Strom zu inhibieren (Nie und Lewis 2001a). Wurde jedoch nur der distale C-terminale Bereich des CNR1 (AS 417 – 472) deletiert, führte die Applikation des CNR1 Agonisten zu einer Inhibition des Ca^{2+} -Stroms (welche jedoch signifikant geringer war als beim Wildtyp). Nie und Lewis schlussfolgerten daraus, dass der proximale C-terminale Bereich des CNR1 von essentieller Bedeutung für die Bindung und Aktivierung der G-Proteine ist, während der distale C-terminale

Bereich nur modulierenden Einfluss auf die Aktivität der G-Proteine hat (Nie und Lewis 2001a). Da der distale C-terminale Bereich modulierend auf die Aktivität der G-Proteine wirkt, untersuchten Nie und Lewis (2001b) in einer weiteren Studie, ob die konstitutive Aktivität des CNR1 durch den distalen C-terminalen Bereich beeinflusst wird und stellten fest, dass die Deletion des distalen Bereiches zu einer stark erhöhten konstitutiven Aktivität des Rezeptors führt (Nie und Lewis 2001b).

Sowohl SNP rs1049353 (453Thr) als auch die neu identifizierte Ala419Glu Variante liegen im distalen C-terminalen Teil des Rezeptors, also in dem Bereich, der modulierend auf die Aktivität der G-Proteine wirkt und einen Einfluss auf die konstitutive Aktivität des Rezeptors hat (Abb. 14). In funktionellen *in-vitro* Studien konnte (wie beschrieben) von Kooperationspartnern gezeigt werden, dass die konstitutive Aktivität von CNR1 bei Trägern der neu identifizierten 419Glu Variante gegenüber der wildtypischen 419Ala Variante um ca. 100 % erhöht ist; während CNR1 ohne Bindung eines Liganden bei Trägern der 419Ala Variante zu 35 – 40 % aktiv ist, zeigen Träger der 419Glu Variante eine konstitutive Aktivität von 75 – 80 %. Die erhaltenen Ergebnisse decken sich also mit Angaben der Literatur, dass der distale C-terminale Bereich von CNR1 einen modulierenden Einfluss auf die konstitutive Aktivität des Rezeptors hat.

Ob aber eine erhöhte konstitutive Aktivität des CNR1 zu einer verschlechterten oder verbesserten Funktion des Rezeptors und letztlich zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme führt, ist unklar. In einer Reihe unterschiedlicher Spezies führt die Aktivierung des CNR1 durch Bindung von CNR1 Agonisten zu einer Stimulation der Nahrungsaufnahme (Pagotto et al. 2006). So wäre es denkbar, dass eine erhöhte konstitutive Aktivität des CNR1 zu einer kontinuierlichen Stimulation der Nahrungsaufnahme führt. Andererseits wäre es aber auch möglich, dass der Rezeptor durch die erhöhte konstitutive Aktivität weniger sensibel gegenüber der Aktivierung durch orexigene Endocannabinoide ist und demzufolge nicht zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme bzw. sogar zu einer verringerten Funktion von CNR1 führt. Für den MC4-Rezeptor konnte z.B. gezeigt werden, dass verschiedene Mutationen, welche zu einer gesteigerten konstitutiven Aktivität des MC4R führen, mit einer verringerten Funktion des MC4R assoziiert sind (Vaisse et al. 2000).

Die deskriptive Statistik der Mutationsträger zeigt, dass der für die Mutation heterozygote Indexpatient im Alter von 11,23 Jahren einen BMI von 26,49 kg/m² hat

(99. BMI-Perzentile), während der ebenfalls für diese Mutation heterozygote Vater bei einem Alter von 51,12 Jahren einen BMI von 28,90 kg/m² (87. BMI-Perzentile) hat und damit sogar etwas weniger übergewichtig ist, als die Mutter, welche homozygot für das wildtypische C-Allel ist (99. BMI-Perzentile). Vorausgesetzt die 419Glu Variante stimuliert tatsächlich die Nahrungsaufnahme, wäre eine mögliche Erklärung für den nur mäßig erhöhten BMI des Vaters z.B., dass der Vater weitere funktionell relevante Sequenzvarianten trägt, welche den BMI positiv beeinflussen und somit einen protektiven Effekt auf das Körpergewicht haben. Eine weitere Erklärung könnten andere Bewegungsgewohnheiten des Vaters sein, die das Körpergewicht und somit den BMI positiv beeinflussen. Da die funktionelle Relevanz dieser Variante jedoch derzeit nicht bekannt ist, sind diese Überlegungen rein spekulativ zu bewerten. Obwohl eine funktionelle Relevanz der 419Glu Variante nicht völlig ausgeschlossen werden kann, kann die generelle Relevanz dieser Variante für polygene Adipositas aufgrund der geringen Häufigkeit (Heterozygotenfrequenz < 0,01) jedoch ausgeschlossen werden.

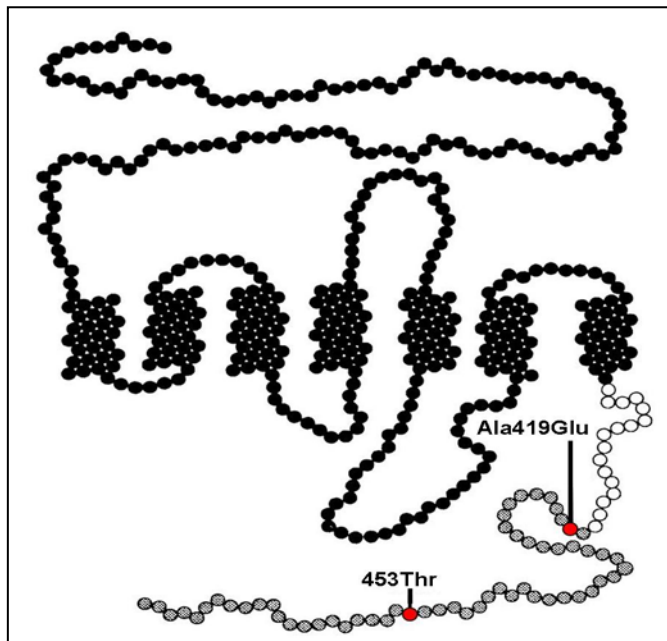


Abbildung 14: Schematische Struktur des CNR1 Proteins. Der C-terminale Bereich ist weiß/grau gekennzeichnet und unterteilt sich in den proximalen (weiß) und distalen (grau) C-terminalen Bereich. Die identifizierten Sequenzvarianten (Ala419Glu; 453Thr) liegen im distalen C-terminalen Bereich und sind rot gekennzeichnet. Nach Nie und Lewis. *Neuroscience* 2001;107:161-167; verändert).

Die 1419+1G/C Variante im *CNR1*

Die 1419+1G/C Variante, welche in einer adipösen Indexpatientin im heterozygoten Zustand detektiert wurde, betrifft das erste Nukleotid nach der kodierenden Region des *CNR1* und führt zu dem Austausch der Base Guanin gegen ein Cytosin. Die Variante wurde erstmals von Gadzicki et al. (2004) beschrieben, die jedoch keine Assoziation mit dem Gilles de la Tourette Syndrom feststellen konnten. Gadzicki et al. (2004) konnten weiterhin zeigen, dass die 1419+1G/C Variante weder einen Einfluss auf die Transkription, noch auf das Splicen des *CNR1* hat (Gadzicki et al. 2004). Da die Variante demzufolge mutmaßlich keinen Einfluss auf die Funktion des *CNR1* hat und zudem sehr selten ist (Heterozygotenfrequenz $< 0,01$), kann davon ausgegangen werden, dass diese Variante keine große Relevanz in der Ätiologie der humanen Adipositas hat.

5.2 Das *FTO* ('fat mass and obesity associated') Gen

5.2.1 Assoziation von rs9939609 mit frühmanifestem (extremem) Adipositas

Durch die Analyse des intronischen *FTO* SNP rs9939609 in 519 deutschen adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 178 normalgewichtigen Erwachsenen konnte die bereits beschriebene Assoziation des rs9939609 A-Allels mit frühmanifestem (extremem) Adipositas bestätigt werden (nominaler einseitiger p-Wert = 0,036; Tab. 30). Das Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen weiterer Studien, die sowohl bei Kindern und Jugendlichen (Frayling et al. 2007, Hinney et al. 2007) als auch bei Erwachsenen (Frayling et al. 2007, Dina et al. 2007b, Scuteri et al. 2007, Peeters et al. 2007, Price et al. 2008, Hunt et al. 2008) sehr eindrucksvoll eine starke Assoziation des rs9939609 A-Allels mit Adipositas zeigen konnten. *FTO* ist demnach als ein solides Polygen für Adipositas zu betrachten.

5.2.2 Assoziation des rs9939609 Genotyps mit der Gewichtsreduktion nach einer einjährigen Adipositas-Interventionstherapie

Von den 519 analysierten adipösen Kindern und Jugendlichen nahmen 207 Individuen an dem einjährigen Adipositas-Interventionsprogramm 'Obeldicks' an der Vestischen Kinderklinik Datteln teil. Obwohl homozygote Träger des zu Adipositas prädisponierenden rs9939609 A-Allels nach der einjährigen Gewichtsreduktionstherapie weniger Gewicht verloren als homozygote Träger des T-Allels ($\Delta\text{BMI-SDS}$ TT: $0,33 \pm 0,40$; TA: $0,25 \pm 0,27$; AA: $0,27 \pm 0,27$), konnte keine signifikante Assoziation des rs9939609 Genotypstatus mit dem Gewichtsverlust

durch die Interventionstherapie festgestellt werden (zweiseitiger nominaler p-Wert = 0,287, Tab. 32). Da die Effektstärke des A-Allels auf den Therapieerfolg deutlich geringer zu sein scheint, als der mehrfach beobachtete Effekt der Variante auf den BMI, sind Analysen in größeren Kollektiven notwendig, um einen Effekt der Variante auf den Gewichtsverlust durch eine Interventionstherapie auszuschließen. Aufgrund der geringen statistischen Aussagekraft kann deshalb ein Einfluss der Variante auf den Therapieerfolg nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Müller et al., *in Revision*). Eine kürzlich durchgeführte Studie, bei welcher ein anderer *FTO* SNP (rs8050136) in 204 adipösen Erwachsenen analysiert wurde, ergab jedoch ebenfalls keinen Hinweis auf den Einfluss dieser Variante auf den Gewichtsverlust nach einer neunmonatigen Gewichtsreduktionstherapie (Haupt et al. 2008).

5.2.3 Assoziation des rs9939609 Genotyps mit Parametern des Glukose- und Fettstoffwechsels

Durch die Analyse von rs9939609 an 480 adipösen Kindern und Jugendlichen konnte keine Assoziation von rs9939609 mit verschiedenen Blutparametern des Glukose- und Fettstoffwechsels (Glukose, Triglyzeride, HDL-Cholesterin sowie LDL-Cholesterin) festgestellt werden (zweiseitige nominale p-Werte > 0,05). Lediglich für Glukose zeigte sich ein geringer Trend für einen additiven Effekt des A-Allels für eine niedrigere Serumglukosekonzentration (AA: 84,37 ± 8,60 mg/dl, AT: 84,67 ± 9,54, TT: 85,54 ± 9,09; 95 % CI: -0,009 – 0,003; zweiseitiger nominaler p-Wert = 0,35, Tab. 33). Ähnlich wie bei der Gewichtsreduktion durch die Interventionstherapie scheint der Effekt des rs9939609 A-Allels auf die analysierten Blutparameter deutlich geringer zu sein, als der wiederholt beschriebene Effekt des A-Allels auf den BMI (Frayling et al. 2007, Hinney et al. 2007, Scuteri et al. 2007), was die Analyse dieser Parameter in deutlich größeren Kollektiven erforderlich macht. Tatsächlich konnte in einer kürzlich erschienen Studie, bei der SNP rs9939609 in 17.037 Europäern analysiert wurde, gezeigt werden, dass jede Kopie des zu Adipositas prädisponierenden A-Allels mit einer Erhöhung von Serumtriglyzeriden und Glukose sowie mit einer Verringerung von HDL-Cholesterin assoziiert ist (Freathy et al. 2008). Weiterhin wurde berichtet, dass der Effekt von rs9939609 auf die beschriebenen Blutparameter erst ab einer Fallzahl von 12.000 Personen festzustellen ist (Freathy et al. 2008).

Die Funktion von FTO ist weitgehend unklar. FTO ist vorwiegend in Zellkernen lokalisiert, wobei *FTO* ubiquitär exprimiert wird (Dina et al. 2007b, Gerken et al. 2007). Eine besonders hohe Konzentration an *FTO* exprimierenden Neuronen wurde dabei im Hypothalamus, v.a. in Arealen mit bekannter Beteiligung an der Gewichtsregulation (wie ARC, VMH, PVN und LHA) identifiziert (Gerken et al. 2007). In Experimenten mit Mäusen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die *FTO* mRNA im ARC durch einen 48 stündigen Futterentzug um 60 % ansteigt, wobei diese Zunahme unabhängig von dem fasteninduzierten Abfall der Serumleptinspiegel ist (Gerken et al. 2007). Dieser Befund konnte jedoch in einer kürzlich erschienenen Studie nicht bestätigt werden; sowohl bei leptindefizienten *ob/ob* Mäusen als auch bei wildtypischen Kontrollen führte ein Futterentzug für 40 std zu einem signifikanten Abfall der hypothalamischen *FTO* Expression (Stratigopoulos et al. 2008). Außerdem zeigten Mäuse mit monogenen Formen der Adipositas (*ob/ob*, *db/db*, *A^Y*, *tub/tub* und *fat/fat*) im Vergleich zu Kontrollen eine geringere Expression von *Fto* im mesenchymalen Fettgewebe (Stratigopoulos et al. 2008).

Jüngste Studien deuten darauf hin, dass das FTO Protein eine 2-Oxoglutarat (2-OG)-abhängige Nukleinsäuredemethylase ist und die Fe(II) und 2-OG-abhängige Demethylierung von 3-Methylthymine in einzelsträngiger DNA katalysiert, wobei als Nebenprodukte Succinat, Formaldehyd und CO₂ entstehen (Gerken et al. 2007). Demzufolge könnte der Einfluss von FTO auf die Gewichtsregulation dadurch zu erklären sein, dass FTO die Expression (an)orexigener Gene durch Veränderung des Methylierungsmusters beeinflusst. Wählen et al. (2007) untersuchte den rs9939609 Genotypstatus im Verhältnis zur Expression von *FTO* in subkutanen Fettbiopsien in 306 Frauen mit einem BMI zwischen 18 und 53 kg/m² und stellte fest, dass adipöse Individuen eine signifikant höhere *FTO* mRNA Expression zeigen als normal- und untergewichtige Individuen. Einen Einfluss des rs9939609 Genotypstatus auf die Expression von *FTO* konnte jedoch nicht festgestellt werden (Wählen et al. 2007). SNP rs9939609 liegt im starken LD mit weiteren Varianten in Intron 1 von *FTO*, wobei alle diese Varianten ebenfalls eine starke Assoziation mit Adipositas zeigen (Hinney et al. 2007, Frayling et al. 2007, Dina et al. 2007b). Da bislang keine weiteren funktionellen Studien über die betreffenden Varianten bekannt sind, bleibt unklar, welcher der SNPs die funktionell relevante Variante ist und die wiederholt beschriebene Assoziation mit Adipositas erklärt. Zudem wäre es möglich, dass die Assoziation der Varianten in

Intron 1 von *FTO* auf bislang unbekannte funktionell relevante Varianten in einer benachbarten Region hindeutet, welche im LD mit den identifizierten Varianten liegen. Des Weiteren ist es möglich, dass die Assoziation der bekannten Varianten mit Adipositas auf funktionell relevante Gene in der Nachbarschaft von *FTO* hindeutet. Beispielsweise liegt das Gen *KIAA1005* 61 kb stromaufwärts des 5' Endes von *FTO* und wird in der entgegengesetzten Richtung transkribiert (Frayling et al. 2007). Bislang gibt es jedoch keinen Hinweis auf eine Beteiligung von *KIAA1005* an der Gewichtsregulation.

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Analysierte Gene des Endocannabinoidsystems; CNR1, NAAA und MGLL

Endocannabinoide stimulieren die Nahrungsaufnahme über die Aktivierung des Cannabinoidrezeptor 1 (CNR1). Der orexigene Effekt der Endocannabinoide wird u.a. limitiert durch die Enzyme N-Azylethanolamin-hydrolysierende Acid Amidase (NAAA) sowie die Monoglyzeridlipase (MGLL). Sowohl der *CNR1* als auch die *NAAA* und die *MGLL* sind demnach als potentielle Kandidatengene für humane Adipositas anzusehen. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die mögliche Assoziation von acht SNPs in dem *CNR1*, vier SNPs in der *NAAA* sowie drei SNPs in der *MGLL* mit frühmanifester (extremer) Adipositas bei 368 deutschen (extrem) adipösen Kindern und Jugendlichen mittels PCR-RFLP, ARMS-PCR sowie MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht. Parallel dazu wurde die kodierende Region des *CNR1* mittels SSCP und dHPLC nach unbekannten (bzw. privaten) Mutationen gescreent.

Bei der Analyse von 368 Adipositastrios konnte mittels TDT (3.12.6) für keinen der untersuchten SNPs eine Assoziation mit frühmanifester (extremer) Adipositas festgestellt werden; alle SNPs zeigten nominale zweiseitige p-Werte > 0,05. Lediglich für den *CNR1* SNP rs1049353 sowie für den *NAAA* SNP rs6819442 wurde ein Trend für eine bevorzugte Transmission des rs1049353 A-Allels bzw. des *NAAA* SNP rs6819442 C-Allels beobachtet (Transmissionsrate des rs1049353 A-Allels 0,55, p=0,12; Transmissionsrate des rs6819442 C-Allels 0,55, p=0,07). Durch die weitere Analyse dieser beiden SNPs in 235 Adipositasquartetten konnte der Trend für eine bevorzugte Transmission des rs1049353 A-Allels nicht bestätigt werden (Transmissionsrate des A-Allels 0,47; p=0,15). Der initiale Trend für die bevorzugte

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Transmission des *NAAA* SNP rs6819442 C-Allels konnte dagegen durch die weitere Analyse von rs6819442 in 235 Adipositasquartetten bestätigt werden (Transmissionsrate des C-Allels 0,51, $p = 0,022$).

Bei dem Mutationsscreen (4.1.2) konnten insgesamt drei Sequenzvarianten im *CNR1* identifiziert werden, der bekannte SNP rs1049353 sowie eine erstmals von Gadzicki et al. (2004) beschriebene 1419+1G/C Variante, welche mutmaßlich keinerlei Auswirkung auf die Funktion des *CNR1* hat (Gadzicki et al. 2004). Des Weiteren wurde eine bislang unbekannte Sequenzvariante detektiert, der Austausch der Base Cytosin gegen ein Adenin an Nukleotid 1256 nach dem Translationsstart (ATG) (c.1256C/A). Im *CNR1* Protein führt diese Variante zu dem nicht-synonymen, nicht-konservativen Austausch der Aminosäure Alanin gegen ein Glutamat an der Stelle 419 des Proteins (Ala419Glu). Von Kooperationspartnern konnte in funktionellen *in-vitro* Untersuchungen gezeigt werden, dass die 419Glu Variante im Vergleich zum 419Ala Wildtyp zu einer 100 % erhöhten konstitutiven Aktivität des *CNR1* führt, was etwa 75 – 80 % der Aktivität unter Ligandenbindung entspricht. In dem in dieser Arbeit durchgeführten Mutationscreen wurde die Ala419Glu als auch die 1419+1G/C Variante jeweils einmal im heterozygoten Zustand detektiert. Beide Mutationsträger erbten die seltene Variante von ihren ebenfalls für diese Mutation heterozygoten Vätern. Da von den analysierten SNPs lediglich der *NAAA* SNP rs6819442 eine nominale Assoziation mit frühmanifesten (extremen) Adipositas zeigte und die neu identifizierte *CNR1* 419Glu Variante sehr selten ist (Heterozygotenfrequenz $< 0,01$), wird geschlossen, dass genetische Variabilität in dem *CNR1*, in der *NAAA* sowie in der *MGLL* keine wesentliche Rolle in der Ätiologie der frühmanifesten (extremen) Adipositas in dem hier untersuchten Kollektiv deutscher (extrem) adipöser Kinder und Jugendlicher spielt.

Das FTO ('fat mass and obesity associated') Gen

Eine Reihe von Vorbefunden haben eindrucksvoll gezeigt, dass genetische Variabilität im Intron 1 des *FTO* ('fat mass and obesity associated') Gens sowohl bei Kindern und Jugendlichen (Frayling et al. 2007, Hinney et al. 2007) als auch bei Erwachsenen (Frayling et al. 2007, Dina et al. 2007, Scuteri et al. 2007, Hunt et al. 2008) mit Adipositas assoziiert ist. Im Rahmen dieser Studie sollte die zuvor berichtete Assoziation des *FTO* SNP rs9939609 mit frühmanifesten (extremen) Adipositas in einem unabhängigen Kollektiv deutscher (extrem) adipöser Kinder und Jugendlicher bestätigt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob Träger des zu

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Adipositas prädisponierenden Allels durch eine einjährige Adipositas-Interventionstherapie weniger Gewicht verlieren, als Träger des nicht zu Adipositas prädisponierenden Allels. Außerdem sollte untersucht werden, ob der Genotypstatus von SNP rs9939609 mit Blutparametern des Glukose- und Fettstoffwechsels (Glukose, Triglyzeride, HDL- und LDL-Cholesterin) assoziiert ist.

Durch die Analyse von rs9939609 bei 519 deutschen (extrem) adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 178 normalgewichtigen Kontrollen konnte die Assoziation des rs9939609 A-Allels mit frühmanifester (extremer) Adipositas bestätigt werden (nominaler einseitiger p-Wert = 0,036). Die Analyse von rs9939609 in 207 adipösen Individuen, welche an dem einjährigen Adipositas-Interventionsprogramm 'Obeldicks' teilnahmen, zeigte einen (nicht signifikanten) Trend, dass Träger des Risikoallels durch die Interventionstherapie weniger Gewicht verlieren als Träger des nicht zu Adipositas prädisponierenden Allels. Der Vergleich der Blutparameter in 480 adipösen Kindern und Jugendlichen zeigte keine Assoziation des rs9939609 Genotypstatus mit Serumwerten von Glukose, Triglyzeriden sowie LDL- und HDL-Cholesterin (alle Variablen zeigten nominale p-Werte > 0,05).

Da die Assoziation des rs9939609 A-Allels mit Adipositas bestätigt werden konnte, wird durch diese Arbeit bestätigt, dass genetische Variabilität im Intron 1 von *FTO* mit Adipositas assoziiert ist und *FTO* ein neues Poygen für Adipositas darstellt. Die mögliche Assoziation des Genotypstatus von SNP rs9939609 mit dem Gewichtsverlust durch eine Adipositas-Interventionstherapie sowie mit Blutparametern des Glukose- und Fettstoffwechsels konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, was mutmaßlich dadurch zu erklären ist, dass der Effekt dieser Variante auf diese Parameter deutlich geringer ist, als der wiederholt beschriebene Effekt dieser Variante auf den BMI. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung von jüngsten Studien, welche zeigen konnten, dass der Effekt von SNP rs9939609 auf die beschriebenen Blutparameter erst ab einer Fallzahl von mindestens 12.000 Individuen zu beobachten ist (Freathy et al. 2008).

7. Referenzen

Aberle J, Fedderwitz I, Klages N, George E, Beil FU. Genetic variation in two proteins of the endocannabinoid system and their influence on body mass index and metabolism under low fat diet. *Horm Metab Res* 2007;**39**:395-397.

Adeyemo A, Luke A, Cooper R, Wu X, Tayo B, Zhu X, Rotimi C, Bouzekri N, Ward R. genome-wide scan for body mass index among Nigerian families. *Obes Res* 2003;**11**:266-273.

Allison DB, Neale MC, Kezis MI, Alfonso VC, Heshka S, Heymsfield SB. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996;**20**:501-506.

Anand BK, Brobeck JR. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951;**77**:323-324.

Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, Nagata T, Kaga T, Ueno N, Fujino MA, Kasuga M. Cocaine-amphetamine-regulated transcript influences energy metabolism, anxiety and gastric emptying in mice. *Horm Metab Res* 2001;**33**:554-558.

Bagdade JD, Bierman EL, Porte D Jr. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest* 1967;**46**:1549-1557.

Barsh GS, Schwartz MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet* 2002;**3**:589-600.

Benzinou M, Chèvre JC, Ward KJ, Lecoœur C, Dina C, Lobbens S, Durand E, Delplanque J, Horber FF, Heude B, Balkau B, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O, Meyre D, Froguel P. Endocannabinoid receptor 1 gene variations increase risk for obesity and modulate body mass index in European populations. *Hum Mol Genet.* 2008;**17**:1916-1921.

Berry EM, Mechoulam R. Tetrahydrocannabinol and endocannabinoids in feeding and appetite. *Pharmacol Ther* 2002;**95**:185-190.

Biebermann H, Castañeda TR, van Landeghem F, von Deimling A, Escher F, Brabant G, Hebebrand J, Hinney A, Tschöp MH, Grüters A, Krude H. A role for beta-melanocyte-stimulating hormone in human body-weight regulation. *Cell Metab* 2006;**3**:141-146.

Brockmann GA, Bevova MR. Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *Trends Genet* 2002;**18**:367-376.

Brønner G, Sattler AM, Hinney A, Soufi M, Geller F, Schäfer H, Maisch B, Hebebrand J, Schaefer JR. The 103I variant of the melanocortin 4 receptor is associated with low serum triglyceride levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:535-538.

Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991;**48**:137-144.

Butler AA, Cone RD. Knockout models resulting in the development of obesity. *Trends Genet* 2001;**17**:S50-54.

Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pellemounter MA, Dekoning J, Baetscher M, Cone RD. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* 2000;**141**:3518-3521.

- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;**348**:1625-1638.
- Calle EE. Obesity and cancer. *BMJ* 2007;**335**:1107-1108.
- Cha SW, Choi SM, Kim KS, Park BL, Kim JR, Kim JY, Shin HD. Replication of Genetic Effects of FTO Polymorphisms on BMI in a Korean Population. *Obesity* (Silver Spring). 2008 Jun 12. [Epub ahead of print].
- Christensen K, Murray JC. What genome-wide association studies can do for medicine. *N Engl J Med* 2007;**356**:1094-1097.
- Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2007;**370**:1706-1713. Erratum in: *Lancet* 2008;**371**:558.
- Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougnères P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998;**392**:398-401.
- Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 1978;**14**:141-148.
- Comings DE, Muhleman D, Gade R, Johnson P, Verde R, Saucier G, MacMurray J. Cannabinoid receptor gene (CNR1): association with i.v. drug use. *Mol Psychiatry* 1997;**2**:161-168.
- Comings DE, Muhleman D, Gade R, Johnson P, Verde R, Saucier G, MacMurray J. Cannabinoid receptor gene (CNR1): association with i.v. drug use. *Mol Psychiatry* 1997;**2**:161-168.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;**334**:292-295.
- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003;**112**:423-431.
- Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 2007;**117**:13-23.
- Dempfle A, Hinney A, Heinzl-Gutenbrunner M, Raab M, Geller F, Gudermann T, Schäfer H, Hebebrand J. Large quantitative effect of melanocortin-4 receptor gene mutations on body mass index. *J Med Genet* 2004;**41**:795-800.
- Després JP, Golay A, Sjöström L; Rimobabant in Obesity-Lipids Study Group. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* 2005;**353**:2121-2134.
- Despres JP. Cardiovascular disease under the influence of excess visceral fat. *Crit Pathw Cardiol* 2007;**6**:51-59.
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988;**34**:605-613.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;**258**:1946-1949.

Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004;**3**:771-784.

Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járαι Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001;**410**:822-825.

Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci* 1998;**21**:521-528.

Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, Lund University, and Novartis Institutes of BioMedical Research, Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Boström K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Råstam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjögren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Riche D, Purcell S. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 2007;**316**:1331-1336.

Dietz WH, Robinson TN. Use of the body mass index (BMI) as a measure of overweight in children and adolescents. *J Pediatr* 1998;**132**:191-193.

Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, Carlsson LM, Kiess W, Vatin V, Lecoœur C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruiz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Le Stunff C, Bougnères P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chèvre JC, Froguel P. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007b;**39**:724-726.

Dina C, Meyre D, Samson C, Tichet J, Marre M, Jouret B, Charles MA, Balkau B, Froguel P. Comment on "A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity". *Science* 2007a;**315**:187.

Ebbeling CB, Pawlak DB, Ludwig DS. Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *Lancet* 2002;**360**:473-482.

Ellis LA, Taylor CF, Taylor GR. A comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC for high throughput mutation scanning. *Hum Mutat* 2000;**15**:556-564.

Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 1996;**381**:415-421.

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;**285**:2486-2497.

- Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999;**341**:879-884.
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002;**110**:1093-1103.
- Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med* 2005;**56**:443-458.
- Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM, Lank E, Bottomley B, Lopez-Fernandez J, Ferraz-Amaro I, Dattani MT, Ercan O, Myhre AG, Retterstol L, Stanhope R, Edge JA, McKenzie S, Lessan N, Ghodsi M, De Rosa V, Perna F, Fontana S, Barroso I, Undlien DE, O'Rahilly S. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med* 2007;**356**:237-247.
- Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:7001-7005.
- Fisher R.A. statistical methods for research workers (7th edition). 1938; Edinburgh, Scotland: Oliver&Boyd.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007;**316**:889-894.
- Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA, Pouta A, Ben-Shlomo Y, Ruukonen A, Ebrahim S, Shields B, Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Lango H, Melzer D, Ferrucci L, Paolisso G, Neville MJ, Karpe F, Palmer CN, Morris AD, Elliott P, Jarvelin MR, Smith GD, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes* 2008;**57**:1419-1426.
- Fredriks AM, van Buuren S, Wit JM, Verloove-Vanhorick SP. Body index measurements in 1996-7 compared with 1980. *Arch Dis Child* 2000;**82**:107-112.
- Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 1986;**876**:288-293.
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;**395**:763-770.
- Gadzicki D, Müller-Vahl K, Stuhmann M. A frequent polymorphism in the coding exon of the human cannabinoid receptor (CNR1) gene. *Mol Cell Probes* 1999;**13**:321-323.

- Gadzicki D, Müller-Vahl KR, Heller D, Ossege S, Nöthen MM, Hebebrand J, Stuhmann M. Tourette syndrome is not caused by mutations in the central cannabinoid receptor (CNR1) gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;**127B**:97-103.
- Gazzerro P, Caruso MG, Notarnicola M, Misciagna G, Guerra V, Laezza C, Bifulco M. Association between cannabinoid type-1 receptor polymorphism and body mass index in a southern Italian population. *Int J Obes (Lond)* 2007;**31**:908-912.
- Geller F, Reichwald K, Dempfle A, Illig T, Vollmert C, Herpertz S, Siffert W, Platzer M, Hess C, Gudermann T, Biebermann H, Wichmann HE, Schäfer H, Hinney A, Hebebrand J. Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am J Hum Genet* 2004;**74**:572-581.
- Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, Yeo GS, McDonough MA, Cunliffe S, McNeill LA, Galvanovskis J, Rorsman P, Robins P, Prieur X, Coll AP, Ma M, Jovanovic Z, Farooqi IS, Sedgwick B, Barroso I, Lindahl T, Ponting CP, Ashcroft FM, O'Rahilly S, Schofield CJ. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 2007;**318**:1469-1472.
- Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1973;**84**:488-495.
- Gómez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo JM, Bilbao A, Del Arco I, Cippitelli A, Nava F, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci* 2002;**22**:9612-9617.
- Gong Y, Lee JN, Brown MS, Goldstein JL, Ye J. Juxtamembranous aspartic acid in Insig-1 and Insig-2 is required for cholesterol homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:6154-6159.
- Götz K, Briscoe J, Rüther U. Homozygous *Ft* embryos are affected in floor plate maintenance and ventral neural tube patterning. *Dev Dyn* 2005;**233**:623-630.
- Guan XM, Yu H, Van der Ploeg LH. Evidence of altered hypothalamic pro-opiomelanocortin/ neuropeptide Y mRNA expression in tubby mice. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;**59**:273-279.
- Hager J, Dina C, Francke S, Dubois S, Houari M, Vatin V, Vaillant E, Lorentz N, Basdevant A, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet* 1998;**20**:304-308.
- Hamdani N, Tabeze JP, Ramoz N, Ades J, Hamon M, Sarfati Y, Boni C, Gorwood P. The CNR1 gene as a pharmacogenetic factor for antipsychotics rather than a susceptibility gene for schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008;**18**:34-40.
- Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nillni EA, Bjørbaek C, Elmquist JK, Flier JS, Hollenberg AN. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest* 2001;**107**:111-120.
- Haupt A, Thamer C, Machann J, Kirchhoff K, Stefan N, Tschritter O, Machicao F, Schick F, Häring HU, Fritsche A. Impact of Variation in the FTO Gene on Whole Body Fat Distribution, Ectopic Fat, and Weight Loss. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 May 29. [Epub ahead of print].

- Hebebrand J, Fichter M, Gerber G, Görg T, Hermann H, Geller F, Schäfer H, Remschmidt H, Hinney A. Genetic predisposition to obesity in bulimia nervosa: a mutation screen of the melanocortin-4 receptor gene. *Mol Psychiatry* 2002;**7**:647-651.
- Hebebrand J, Hinney A, Oeffner F. Molekulare Grundlagen der Adipositas. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg) Molekularmedizinische Grundlagen von Endocrinopathien. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* 2001a;S.387-426.
- Hebebrand J, Sommerlad C, Geller F, Görg T, Hinney A. The genetics of obesity: practical implications. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001b;**25 Suppl 1**:S10-8
- Hebebrand J. Percentiles for the body mass index based on data of the German nutritional survey and a review of relevant factors with an influence on body weight. *Aktuelle Ernährungsmedizin* 1994;**19**:259-265.
- Heid IM, Vollmert C, Hinney A, Döring A, Geller F, Löwel H, Wichmann HE, Illig T, Hebebrand J, Kronenberg F; KORA Group. Association of the 103I MC4R allele with decreased body mass in 7937 participants of two population based surveys. *J Med Genet* 2005;**42**:e21.
- Heller D, Schneider U, Seifert J, Cimander KF, Stuhmann M. The cannabinoid receptor gene (CNR1) is not affected in German i.v. drug users. *Addict Biol* 2001;**6**:183-187.
- Herbert A, Gerry NP, McQueen MB, Heid IM, Pfeufer A, Illig T, Wichmann HE, Meitinger T, Hunter D, Hu FB, Colditz G, Hinney A, Hebebrand J, Koberwitz K, Zhu X, Cooper R, Ardlie K, Lyon H, Hirschhorn JN, Laird NM, Lenburg ME, Lange C, Christman MF. A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science* 2006;**312**:279-283.
- Herman AI, Kranzler HR, Cubells JF, Gelernter J, Covault J. Association study of the CNR1 gene exon 3 alternative promoter region polymorphisms and substance dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006;**141**:499-503.
- Herpertz-Dahlmann B, Geller F, Böhle C, Khalil C, Trost-Brinkhues G, Ziegler A, Hebebrand J. Secular trends in body mass index measurements in preschool children from the City of Aachen, Germany. *Eur J Pediatr* 2003;**162**:104-109.
- Hetherington AW, Ranson SW. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec* 1940;**78**:149-172.
- Hill WG, Goddard ME, Visscher PM. Data and Theory Points to Mainly Additive Genetic Variance for Complex Traits. *PlosGenet* 2008;**4**: e1000008.
- Hinney A, Remschmidt H, Hebebrand J. Candidate gene polymorphisms in eating disorders. *Eur J Pharmacol* 2000b;**410**:147-159.
- Hinney A, Ziegler A, Oeffner F, Wedewardt C, Vogel M, Wulfstange H, Geller F, Stübing K, Siegfried W, Goldschmidt HP, Remschmidt H, Hebebrand J. Independent confirmation of a major locus for obesity on chromosome 10. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:2962-2965. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab* 2000a;**85**:3972.
- Hinney A, Bettecken T, Tarnow P, Brumm H, Reichwald K, Lichtner P, Scherag A, Nguyen TT, Schlumberger P, Rief W, Vollmert C, Illig T, Wichmann HE, Schäfer H, Platzer M, Biebermann H, Meitinger T, Hebebrand J. Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:1761-1769.

- Hinney A, Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter AK, Brokamp B, Goldschmidt H, Siegfried W, Remschmidt H, Schäfer H, Gudermann T, Hebebrand J. Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;**88**:4258-4267.
- Hinney A, Nguyen TT, Scherag A, Friedel S, Brönnner G, Müller TD, Grallert H, Illig T, Wichmann HE, Rief W, Schäfer H, Hebebrand J. Genome Wide Association (GWA) Study for Early Onset Extreme Obesity Supports the Role of Fat Mass and Obesity Associated Gene (FTO) Variants. *PLoS ONE* 2007;**2**:e1361.
- Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibült O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Görg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J. Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**:1483-1486.
- Hopfer CJ, Young SE, Purcell S, Crowley TJ, Stallings MC, Corley RP, Rhee SH, Smolen A, Krauter K, Hewitt JK, Ehringer MA. Cannabis receptor haplotype associated with fewer cannabis dependence symptoms in adolescents. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006;**141B**:895-901.
- Hotta K, Nakata Y, Matsuo T, Kamohara S, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Masuzaki H, Yoneda M, Nakajima A, Miyazaki S, Tokunaga K, Kawamoto M, Funahashi T, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Yoshimatsu H, Nakao K, Sakata T, Matsuzawa Y, Tanaka K, Kamatani N, Nakamura Y. Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese. *J Hum Genet* 2008;**53**:546-553.
- Hu G, Jousilahti P, Nissinen A, Antikainen R, Kivipelto M, Tuomilehto J. Body mass index and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 2006;**67**:1955-1959.
- Hulens M, Beunen G, Claessens AL, Lefevre J, Thomis M, Philippaerts R, Borms J, Vrijens J, Lysens R, Vansant G. Trends in BMI among Belgian children, adolescents and adults from 1969 to 1996. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;**25**:395-399.
- Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 1966;**153**:1127-1128.
- Hunt SC, Stone S, Xin Y, Scherer CA, Magness CL, Iadonato SP, Hopkins PN, Adams TD. Association of the FTO Gene With BMI. *Obesity (Silver Spring)* 2008 [Epub ahead of print]
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997;**88**:131-141.
- Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 1950;**41**:317-318.
- Iwasaki S, Ishiguro H, Higuchi S, Onaivi ES, Arinami T. Association study between alcoholism and endocannabinoid metabolic enzyme genes encoding fatty acid amide hydrolase and monoglyceride lipase in a Japanese population. *Psychiatr Genet* 2007;**17**:215-220.

- Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O'Rahilly S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 1997;**16**:303-306.
- Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Péleraux A, Pénarier G, Soubrié P, Le Fur G, Galiègue S, Casellas P. The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J* 2005;**19**:1567-1569.
- Jürgens HS, Schürmann A, Kluge R, Ortmann S, Klaus S, Joost HG, Tschöp MH. Hyperphagia, lower body temperature, and reduced running wheel activity precede development of morbid obesity in New Zealand obese mice. *Physiol Genomics* 2006;**25**:234-241.
- Kalies H, Lenz J, von Kries R. Prevalence of overweight and obesity and trends in body mass index in German pre-school children, 1982-1997. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;**26**:1211-1217.
- Kapeller R, Moriarty A, Strauss A, Stubdal H, Theriault K, Siebert E, Chickering T, Morgenstern JP, Tartaglia LA, Lillie J. Tyrosine phosphorylation of tub and its association with Src homology 2 domain-containing proteins implicate tub in intracellular signaling by insulin. *J Biol Chem* 1999;**274**:24980-24986.
- Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1953;**140**:578-596.
- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol* 2002;**136**:550-557.
- Kleyn PW, Fan W, Kovats SG, Lee JJ, Pulido JC, Wu Y, Berkemeier LR, Misumi DJ, Holmgren L, Charlat O, Woolf EA, Tayber O, Brody T, Shu P, Hawkins F, Kennedy B, Baldini L, Ebeling C, Alperin GD, Deeds J, Lakey ND, Culpepper J, Chen H, Glücksmann-Kuis MA, Carlson GA, Duyk GM, Moore KJ. Identification and characterization of the mouse obesity gene tubby: a member of a novel gene family. *Cell* 1996;**85**:281-290.
- Kloting N, Stumvoll M, Bluher M. [The biology of visceral fat]. *Internist (Berl)* 2007;**48**:126-133.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998;**393**:72-76.
- Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, Geller F, Geiß HC, Hesse V, von Hippel A, Jaeger U, Johnson D, Kiess W, Korte W, Kunze D, Menner K, Müller M, Niemann-Pilatus A, Remer T, Schaefer F, Wittchen HU, Zabransky S, Zellner K, Hebebrand J. Perzentilen für den Body Mass Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschr Kinderheilkd* 2001;**149**:807-818.
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 1998;**19**:155-157.

- Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE, Grüters A. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:4633-4640.
- Kurth BM, Schaffrath Rosario A. [The prevalence of overweight and obese children and adolescents living in Germany. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2007;**50**:736-743.
- Kushi A, Sasai H, Koizumi H, Takeda N, Yokoyama M, Nakamura M. Obesity and mild hyperinsulinemia found in neuropeptide Y-Y1 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**:15659-15664.
- Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 1998;**29**:293-298.
- Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994;**265**:2037-2048.
- Leroy S, Griffon N, Bourdel MC, Olié JP, Poirier MF, Krebs MO. Schizophrenia and the cannabinoid receptor type 1 (CB1): association study using a single-base polymorphism in coding exon 1. *Am J Med Genet* 2001;**105**:749-752.
- Li H, Wu Y, Loos RJ, Hu FB, Liu Y, Wang J, Yu Z, Lin X. Variants in the fat mass- and obesity-associated (FTO) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. *Diabetes* 2008;**57**:264-268.
- Li T, Liu X, Zhu ZH, Zhao J, Hu X, Ball DM, Sham PC, Collier DA. No association between (AAT)_n repeats in the cannabinoid receptor gene (CNR1) and heroin abuse in a Chinese population. *Mol Psychiatry* 2000;**5**:128-130.
- Lichtman AH, Cravatt BF. Food for thought: endocannabinoid modulation of lipogenesis. *J Clin Invest* 2005;**115**:1130-1133.
- Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O'Kirwan F, Whitby R, Liang L, Cohen P, Bhasin S, Krauss RM, Veldhuis JD, Wagner AJ, DePaoli AM, McCann SM, Wong ML. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:4531-4536.
- Loos RJ, Barroso I, O'rahilly S, Wareham NJ. Comment on "A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity". *Science* 2007;**315**:187.
- Lu XY, Barsh GS, Akil H, Watson SJ. Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J Neurosci* 2003;**23**:7863-7872.
- Lyon HN, Emilsson V, Hinney A, Heid IM, Lasky-Su J, Zhu X, Thorleifsson G, Gunnarsdottir S, Walters GB, Thorsteinsdottir U, Kong A, Gulcher J, Nguyen TT, Scherag A, Pfeufer A, Meitinger T, Brönner G, Rief W, Soto-Quiros ME, Avila L, Klanderman B, Raby BA, Silverman EK, Weiss ST, Laird N, Ding X, Groop L, Tuomi T, Isomaa B, Bengtsson K, Butler JL, Cooper RS, Fox CS, O'Donnell CJ, Vollmert C, Celedón JC, Wichmann HE, Hebebrand J, Stefansson K, Lange C, Hirschhorn JN. The association of a SNP upstream of INSIG2 with body mass index is reproduced in several but not all cohorts. *PLoS Genet* 2007;**3**:e61.

Referenzen

- Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 1997;**27**:325-351.
- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* 2006;**29**:225-232.
- Martin ER, Monks SA, Warren LL, Kaplan NL. A test for linkage and association in general pedigrees: the pedigree disequilibrium test. *Am J Hum Genet.* 2000;**67**:146-54.
- Martínez-Gras I, Hoenicka J, Ponce G, Rodríguez-Jiménez R, Jiménez-Arriero MA, Pérez-Hernandez E, Ampuero I, Ramos-Atance JA, Palomo T, Rubio G. (AAT)n repeat in the cannabinoid receptor gene, CNR1: association with schizophrenia in a Spanish population. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2006;**256**:437-441.
- Matias I, Vergoni AV, Petrosino S, Ottani A, Pocai A, Bertolini A, Di Marzo V. Regulation of hypothalamic endocannabinoid levels by neuropeptides and hormones involved in food intake and metabolism: Insulin and melanocortins. *Neuropharmacology* 2008;**54**:206-212.
- McCarthy HD. Body fat measurements in children as predictors for the metabolic syndrome: focus on waist circumference. *Proc Nutr Soc* 2006;**65**:385-392.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995;**50**:83-90.
- Mei Z, Grummer-Strawn LM, Pietrobelli A, Goulding A, Goran MI, Dietz WH. Validity of body mass index compared with other body-composition screening indexes for the assessment of body fatness in children and adolescents. *Am J Clin Nutr* 2002;**75**:978-985.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;**16**:1215.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997;**387**:903-908.
- Moreno LA, Sarria A, Fleta J, Rodriguez G, Gonzalez JM, Bueno M. Sociodemographic factors and trends on overweight prevalence in children and adolescents in Aragon (Spain) from 1985 to 1995. *J Clin Epidemiol* 2001;**54**:921-927.
- Müller TD, Reichwald K, Wermter AK, Brönner G, Nguyen TT, Friedel S, Koberwitz K, Engeli S, Lichtner P, Meitinger T, Schäfer H, Hebebrand J, Hinney A. No evidence for an involvement of variants in the cannabinoid receptor gene (CNR1) in obesity in German children and adolescents. *Mol Genet Metab* 2007;**90**:429-934.
- Müller-Vahl KR. Cannabinoids reduce symptoms of Tourette's syndrome. *Expert Opin Pharmacother* 2003;**4**:1717-1725.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;**365**:61-65.
- Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet* 1995;**10**:135-142.

- Naveilhan P, Hassani H, Canals JM, Ekstrand AJ, Larefalk A, Chhajlani V, Arenas E, Gedda K, Svensson L, Thoren P, Ernfors P. Normal feeding behavior, body weight and leptin response require the neuropeptide Y Y2 receptor. *Nat Med* 1999;**5**:1188-1193.
- Neel JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 1962;**14**:353-362.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989;**17**:2503-2516.
- Nishina M, Kikuchi T, Yamazaki H, Kameda K, Hiura M, Uchiyama M. Relationship among systolic blood pressure, serum insulin and leptin, and visceral fat accumulation in obese children. *Hypertens Res* 2003;**26**:281-288.
- Ochoa MC, Azcona C, Biebermann H, Brumm H, Razquin C, Wermter AK, Martínez JA, Hebebrand J, Hinney A, Moreno-Aliaga MJ, Marti A, Patiño A, Chueca M, Oyarzabal M, Pelach R; Grupo de Estudio Navarro de la Obesidad Infantil (GENOI). A novel mutation Thr162Arg of the melanocortin 4 receptor gene in a Spanish children and adolescent population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;**66**:652-658.
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 2006;**295**:1549-1555.
- Ogden CL, Fryar CD, Carroll MD, Flegal KM. Mean body weight, height, and body mass index, United States 1960-2002. *Adv Data* 2004;**347**:1-17.
- Ohashi J, Naka I, Kimura R, Natsuhara K, Yamauchi T, Furusawa T, Nakazawa M, Ataka Y, Patarapotikul J, Nuchnoi P, Tokunaga K, Ishida T, Inaoka T, Matsumura Y, Ohtsuka R. FTO polymorphisms in oceanic populations. *J Hum Genet* 2007;**52**:1031-1035.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;**86**:2766-2770.
- Osei-Hyiaman D, Depetrillo M, Harvey-White J, Bannon AW, Cravatt BF, Kuhar MJ, Mackie K, Palkovits M, Kunos G. Cocaine- and amphetamine-related transcript is involved in the orexigenic effect of endogenous anandamide. *Neuroendocrinology* 2005b;**81**:273-282.
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005a;**115**:1298-1305.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 2006;**27**:73-100.
- Pankau 2005; in Wabitsch, Hebebrand, Kiess, Zwiauer: Adipositas bei Kindern und Jugendlichen; *Springer Verlag Berlin Heidelberg New York* 2005; S.37 – 49.
- Peeters A, Beckers S, Verrijken A, Roevens P, Peeters P, Van Gaal L, Van Hul W. Variants in the FTO gene are associated with common obesity in the Belgian population. *Mol Genet Metab* 2007 [Epub ahead of print].

- Perola M, Ohman M, Hiekkalinna T, Leppävuori J, Pajukanta P, Wessman M, Koskenvuo M, Palotie A, Lange K, Kaprio J, Peltonen L. Quantitative-trait-locus analysis of body-mass index and of stature, by combined analysis of genome scans of five Finnish study groups. *Am J Hum Genet* 2001;**69**:117-123.
- Peters T, Ausmeier K, Dildrop R, Rütther U. The mouse Fused toes (Ft) mutation is the result of a 1.6-Mb deletion including the entire Iroquois B gene cluster. *Mamm Genome* 2002;**13**:186-168.
- Peters T, Ausmeier K, Rütther U. Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mamm Genome* 1999;**10**:983-986.
- Petersen TA, Rasmussen S, Madsen M. [BMI of Danish school children measured during the periods 1986/1987--1996/1997 compared to Danish measurement in 1971/1972]. *Ugeskr Laeger* 2002;**164**:5006-5010.
- Pietiläinen KH, Virtanen SM, Rissanen A, Rita H, Mäenpää J. Distribution and heritability of BMI in Finnish adolescents aged 16y and 17y: a study of 4884 twins and 2509 singletons. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;**23**:107-115.
- Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J; RIO-North America Study Group. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006;**295**:761-75. Erratum in: *JAMA* 2006;**295**:1252.
- Preuss UW, Koller G, Zill P, Bondy B, Soyka M. Alcoholism-related phenotypes and genetic variants of the CB1 receptor. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2003;**253**:275-280.
- Puffenbarger RA. Molecular biology of the enzymes that degrade endocannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005;**4**:625-31.
- Qian S, Chen H, Weingarh D, Trumbauer ME, Novi DE, Guan X, Yu H, Shen Z, Feng Y, Frazier E, Chen A, Camacho RE, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Marsh DJ. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol Cell Biol* 2002;**22**:5027-5035.
- Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, Soubrie P. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;**284**:R345-353.
- Ravinet Trillou C, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrie P. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;**28**:640-648.
- Reinehr T, Hinney A, Nguyen TT, Hebebrand J. Evidence of an influence of a polymorphism near the INSIG2 on weight loss during a lifestyle intervention in obese children and adolescents. *Diabetes* 2007; **57**:623-626.
- Rettenbacher E, Tarnow P, Brumm H, Prayer D, Wermter AK, Hebebrand J, Biebermann H, Hinney A, Widhalm K. A novel non-synonymous mutation in the melanocortin-4 receptor gene (MC4R) in a 2-year-old Austrian girl with extreme obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007;**115**:7-12.
- Rice TK, Schork NJ, Rao DC. Methods for handling multiple testing. *Adv Genet* 2008;**60**:293-308.

- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, et al. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 1994;**350**:240-244.
- Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempé M, Tichet J, Rossignol C, Charraud A. Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* 1991;**45**:13-21.
- Rolland-Cachera MF, Sempe M, Guillaud-Bataille M, Patois E, Pequignot-Guggenbuhl F, Fautrad V. Adiposity indices in children. *Am J Clin Nutr* 1982;**36**:178-184.
- Roszkopf D, Bornhorst A, Rimmbach C, Schwahn C, Kayser A, Krüger A, Tessmann G, Geissler I, Kroemer HK, Völzke H. Comment on "A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity". *Science* 2007;**315**:187.
- Rucker D, Padwal R, Li SK, Curioni C, Lau DC. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *BMJ* 2007;**335**:1194-1199.
- Russo P, Strazzullo P, Cappuccio FP, Tregouet DA, Lauria F, Loguercio M, Barba G, Versiero M, Siani A. Genetic variations at the endocannabinoid type 1 receptor gene (CNR1) are associated with obesity phenotypes in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:2382-2386.
- Saar K, Geller F, Rüschendorf F, Reis A, Friedel S, Schäuble N, Nürnberg P, Siegfried W, Goldschmidt HP, Schäfer H, Ziegler A, Remschmidt H, Hinney A, Hebebrand J. Genome scan for childhood and adolescent obesity in German families. *Pediatrics* 2003;**111**:321-327.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 1988;**239**:487-491.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;**74**:5463-5467.
- Saunders CL, Chiodini BD, Sham P, Lewis CM, Abkevich V, Adeyemo AA, de Andrade M, Arya R, Berenson GS, Blangero J, Boehnke M, Borecki IB, Chagnon YC, Chen W, Comuzzie AG, Deng HW, Duggirala R, Feitosa MF, Froguel P, Hanson RL, Hebebrand J, Huezo-Dias P, Kissebah AH, Li W, Luke A, Martin LJ, Nash M, Ohman M, Palmer LJ, Peltonen L, Perola M, Price RA, Redline S, Srinivasan SR, Stern MP, Stone S, Stringham H, Turner S, Wijmenga C, Collier D. Meta-analysis of genome-wide linkage studies in BMI and obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2007;**15**:2263-2275.
- Schmidt LG, Samochowiec J, Finckh U, Fiszer-Piosik E, Horodnicki J, Wendel B, Rommelspacher H, Hoehe MR. Association of a CB1 cannabinoid receptor gene (CNR1) polymorphism with severe alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend* 2002;**65**:221-224.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;**404**:661-671.
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007;**316**:1341-1345.

- Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orrú M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR. Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits. *PLoS Genet* 2007;**3**:e115
- Seifert J, Ossege S, Emrich HM, Schneider U, Stuhmann M. No association of CNR1 gene variations with susceptibility to schizophrenia. *Neurosci Lett* 2007;**426**:29-33.
- Siegfried Z, Kanyas K, Latzer Y, Karni O, Bloch M, Lerer B, Berry EM. Association study of cannabinoid receptor gene (CNR1) alleles and anorexia nervosa: differences between restricting and binge/purging subtypes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;**125**:126-130.
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007;**445**:881-885.
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993;**52**:506-516.
- Stamatakis E, Primatesta P, Chinn S, Rona R, Falaschetti E. Overweight and obesity trends from 1974 to 2003 in English children: what is the role of socioeconomic factors? *Arch Dis Child* 2005;**90**:999-1004.
- Stratigopoulos G, Padilla SL, LeDuc CA, Watson E, Hattersley AT, McCarthy MI, Zeltser LM, Chung WK, Leibel RL. Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;**294**:R1185-96.
- Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 1998;**18**:213-215.
- Stunkard AJ, Foch TT, Hrubec Z. A twin study of human obesity. *JAMA* 1986a;**256**:51-54.
- Stunkard AJ, Foster GD, Grossman RF. An adoption study of human obesity. *N Engl J Med* 1986b;**314**:193-198.
- Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 1990;**322**:1483-1487.
- Stutzmann F, Vatin V, Cauchi S, Morandi A, Jouret B, Landt O, Tounian P, Levy-Marchal C, Buzzetti R, Pinelli L, Balkau B, Horber F, Bougnères P, Froguel P, Meyre D. Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: the two facets of a Janus obesity gene. *Hum Mol Genet.* 2007;**16**:1837-44.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;**215**:89-97.
- Tao YX, Segaloff DL. Functional analyses of melanocortin-4 receptor mutations identified from patients with binge eating disorder and nonobese or obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:5632-5638.

- Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 1982;**296**:659-660.
- Thornton-Jones ZD, Kennett GA, Benwell KR, Revell DF, Misra A, Sellwood DM, Vickers SP, Clifton PG. The cannabinoid CB1 receptor inverse agonist, rimonabant, modifies body weight and adiponectin function in diet-induced obese rats as a consequence of reduced food intake. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;**84**:353-359.
- Tschöp M, Heiman ML. Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;**109**:307-319.
- Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000;**407**:908-913.
- Tucci SA, Rogers EK, Korbonits M, Kirkham TC. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. *Br J Pharmacol* 2004;**143**:520-523.
- Ujike H, Takaki M, Nakata K, Tanaka Y, Takeda T, Kodama M, Fujiwara Y, Sakai A, Kuroda S. CNR1, central cannabinoid receptor gene, associated with susceptibility to hebephrenic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2002;**7**:515-518.
- Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 2000;**106**:253-262.
- Van der Hoeven F, Schimmang T, Volkmann A, Mattei MG, Kyewski B, Rüther U. Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (Ft). *Development* 1994;**120**:2601-2607.
- Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S; RIO-Europe Study Group. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 2005;**365**:1389-1397.
- Van Gaal LF, Vansant GA, De Leeuw IH. Upper body adiposity and the risk for atherosclerosis. *J Am Coll Nutr* 1989;**8**:504-514.
- Verty AN, McGregor IS, Mallet PE. Paraventricular hypothalamic CB(1) cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology* 2005;**49**:1101-1109.
- Voisey J, van Daal A. Agouti: from mouse to man, from skin to fat. *Pigment Cell Res* 2002;**15**:10-18.
- Wagener A, Schmitt AO, Aksu S, Schlote W, Neuschl C, Brockmann GA. Genetic, sex, and diet effects on body weight and obesity in the Berlin Fat Mouse Inbred lines. *Physiol Genomics* 2006;**27**:264-270.
- Wang CL, Liang L, Wang HJ, Fu JF, Hebebrand J, Hinney A. Several mutations in the melanocortin 4 receptor gene are associated with obesity in Chinese children and adolescents. *J Endocrinol Invest* 2006;**29**:894-898.
- Wang Y, Seburn K, Bechtel L, Lee BY, Szatkiewicz JP, Nishina PM, Naggert JK. Defective carbohydrate metabolism in mice homozygous for the tubby mutation. *Physiol Genomics* 2006;**27**:131-140.
- Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med* 1997;**337**:869-873.

- Whitmer RA, Gunderson EP, Quesenberry CP Jr, Zhou J, Yaffe K. Body mass index in midlife and risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Curr Alzheimer Res* 2007;**4**:103-109.
- WHO 2006: Fact Sheet N° 311 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311>).
- WHO/IASO/IOTF. The Asia-Pacific perspective: redefining obesity and its treatment. Health Communications Australia: Melbourne, 2000.
- Woods SC, Gibbs J. The regulation of food intake by peptides. *Ann N Y Acad Sci* 1989;**575**:236-243.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D Jr. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 1979;**282**:503-505.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D Jr, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 1998;**280**:1378-1383.
- Wuschke S, Dahm S, Schmidt C, Joost HG, Al-Hasani H. A meta-analysis of quantitative trait loci associated with body weight and adiposity in mice. *Int J Obes (Lond)* 2007;**31**:829-841.
- Xiang Z, Litherland SA, Sorensen NB, Proneth B, Wood MS, Shaw AM, Millard WJ, Haskell-Luevano C. Pharmacological characterization of 40 human melanocortin-4 receptor polymorphisms with the endogenous proopiomelanocortin-derived agonists and the agouti-related protein (AGRP) antagonist. *Biochemistry* 2006;**45**:7277-7288.
- Xie T, Ho SL, Ma OC. High resolution single strand conformation polymorphism analysis using formamide and ethidium bromide staining. *Mol Pathol* 1997;**50**:276-278.
- Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 2003;**6**:736-742.
- Young EH, Wareham NJ, Farooqi S, Hinney A, Hebebrand J, Scherag A, O'rahilly S, Barroso I, Sandhu MS. The V103I polymorphism of the MC4R gene and obesity: population based studies and meta-analysis of 29 563 individuals. *Int J Obes (Lond)* 2007;**31**:1437-1441.
- Zhang PW, Ishiguro H, Ohtsuki T, Hess J, Carillo F, Walther D, Onaivi ES, Arinami T, Uhl GR. Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Mol Psychiatry* 2004;**9**:916-931.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;**372**:425-32. Erratum in: *Nature* 1995;**374**:479.

8. Anhang

8.1 Sequenz des gescreenten Bereichs von dem *CNR1*

```
>Chromosom:NCBI35:6:88909294:88912712:-1

5`-gttttccctcctcttaggattgccccctgtgggtcactttctcagtcattttgagctcagcctaatacaaga
ctgagggttATGAAGTCGATCCTAGATGGCCTTGCAGATACACCTTCCGCACCATCACCCTGACCTCCTGTACG
TGGGCTCAAATGACATTACGTACGAAGACATCAAAGGTGACATGGCATCCAAATTAGGGTACTTCCACAGAAAT
TCCCTTTAACTTCCTTTAGGGGAAGTCCCTTCCAAGAGAAGATGACTGCGGGAGACAACCCCCAGCTAGTCCCAG
CAGACCAGGTGAACATTACAGAATTTTACAACAAGTCTCTCTCGTCCTTCAAGGAGAATGAGGAGAACATCCAGT
GTGGGGAGAACTTCATGGACATAGAGTGTTCATGGTCCTGAACCCAGCCAGCAGCTGGCCATTGCAGTCCTGT
CCCTCACGCTGGGCACCTTCACGGTCCTGGAGAACCTCCTGGTGCTGTGCGTCATCCTCCACTCCCGCAGCCTCC
GCTGCAGGCCTTCTTACCATTCATCGGCAGCCTGGCGGTGGCAGACCTCCTGGGGAGTGTCATTTTGTCTACA
GCTTCATTGACTTCCACGTGTTCCACCGCAAGATAGCCGCAACGTGTTTCTGTTCAAACCTGGGTGGGGTACCGG
CCTCCTTCACTGCCTCCGTGGGCAGCCTGTTTCTCACAGCCATCGACAGGTACATATCCATTACAGGCCCTCGG
CCTATAAGAGGATTGTACCAGGCCCAAGGCCGTGGTGGCGTTTTTGCCTGATGTGGACCATAGCCATTGTGATCG
CCGTGCTGCCTCTCCTGGGCTGGAAGTGCAGAGAACTGCAATCTGTTTGCTCAGACATTTTCCACACATTGATG
AAACCTACCTGATGTTCTGGATCGGGGTCACCAGCGTACTGCTTCTGTTTCATCGTGTATGCGTACATGTATATTC
TCTGGAAGGCTCACAGCCACGCCGTCCGCATGATTACAGCGTGGCACCAGAGAGCATCATCATCCACACGTCTG
AGGATGGGAAGGTACAGGTGACCCGGCCAGACCAAGCCCGCATGGACATTAGGTTAGCCAAGACCCTGGTCTCTGA
TCCTGGTGGTGTGATCATCTGCTGGGGCCCTCTGCTTGCAATCATGGTGTATGATGTCTTTGGGAAGATGAACA
AGCTCATTAAAGACGGTGTGTTGCAATTCTGCAGTATGCTCTGCCTGCTGAACCTCCACCGTGAACCCCATCATCTATG
CTCTGAGGAGTAAGGACCTGCGACACGCTTTCCGGAGCATGTTTCCCTCTTGTGAAGGCACCTGCGCAGCCTCTGG
ATAACAGCATGGGGGACTCGGACTGCCTGCACAAACACGCAAAACAATGCAGCCAGTGTTTACAGGGCCCGAGAAA
GCTGCATCAAGAGCACGGTCAAGATTGCCAAGGTAACCATGTCTGTGTCCACAGACACGTCTGCCGAGGCTCTGT
GAgcctgatgcctccctggcagcacaggaaaagaattttttttttaagctcaaaatctagaagagtctattgtc
tccttggttatattttttaactttaccatgctcaatgaaaagggtg-3`
```

Abbildung 15: Sequenz des gescreenten Bereichs von dem *CNR1*. Die Primersequenzen der fünf überlappenden Fragmente sind fett und farbig markiert sowie unterstrichen; Primer Fragment 1: schwarz; Fragment 2: blau; Fragment 3: grün; Fragment 4: rot; Fragment 5: lila. Die mittels SSCP detektierten Varianten in Fragment 5 sind gelb gekennzeichnet; der Translationsstart (ATG) ist rot markiert; der kodierende Bereich ist grau markiert.

8.2 Eigene Publikationen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit veröffentlichte Publikationen

Müller T.D, Hinney A, Scherag A, Nguyen T.T, Schreiner F, Schäfer H, Hebebrand J, Roth CL, Reinehr T. 'Fat mass and obesity associated' gene (*FTO*): no significant association of variant rs9939609 with weight loss in a lifestyle intervention and lipid metabolism markers in German obese children and adolescents. *BMC Med Genet. In Revision*.

Müller T.D, Reichwald K, Wermter A-K, Brönner G, Nguyen T.T, Friedel S, Koberwitz K, Engeli S, Lichtner P, Meitinger T, Schäfer H, Hebebrand J, Hinney A. No evidence for an involvement of variants in the cannabinoid receptor gene (*CNR1*) in obesity in German children and adolescents. *Mol Genet Metab* 2007;**90**:429-434.

Weitere Publikationen

Friedel S, Müller T.D, Brönner G, Hinney A, Hebebrand J: Genetische Ursachen der Adipositas, S. 55-65; Reinehr T, Müller MJ, Hebebrand J: Kritische Betrachtung der Erfolge vorhandener Präventions- und Therapieansätze, S. 113-117 in Reinehr T, Wabitsch M: Adipositas in praxi – Multimodale Konzepte für das Kindes- und Jugendalter. *Hans Marseille Verlag*, München, 2006

Hebebrand J, Müller T.D, Friedel S, Hinney A. Gene, die wahren Dickmacher? *Biol. Unserer Zeit*. 2006;**4**:208-210.

Hebebrand J, Müller T.D, Holtkamp K, Herpertz-Dahlmann B. The role of leptin in anorexia nervosa: clinical implications. *Mol Psychiatry* 2007;**12**:23-35.

Hinney A, Müller T.D, Friedel S, Hebebrand J. Dicke Gene – schweres Erbe? *AdipositasSpektrum* 2007;**4**:12-14.

Hinney A, Nguyen TT, Scherag A, Brönner G, Friedel S, Müller T.D, Rief W, Schäfer H, Hebebrand J. Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS ONE* 2007;**2**:e1361.

Müller T.D, Brönner G, Friedel S, Hinney A, Hebebrand J. Übergewicht – liegt es doch an den Genen? *GenomXPress Sonderausgabe* **02/07**:23-26.

Müller T.D, Föcker M, Holtkamp K, B. Herpertz-Dahlmann, J Hebebrand. Leptin mediated neuroendocrine alterations in anorexia nervosa: somatic and behavioural implications. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am. In Submission*.

Müller T.D, Reichwald K, Brönner G, Kirschner J, Nguyen T.T, Scherag A, Herzog W, Herpertz-Dahlmann B, Lichtner P, Meitinger T, Schäfer H, Hebebrand J, Hinney A. Brief Communication: Lack of association of genetic variants in genes of the endocannabinoid system with anorexia nervosa. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health. In Submission*.

Reinehr T, Friedel S, Müller T.D, Toschke A.M, Hebebrand J, Hinney A. Evidence for an influence of *TCF7L2* polymorphism *rs7903146* on insulin resistance and sensitivity indices in overweight children and adolescents during a lifestyle intervention. *Int J Obes* 2008. *In Press*.

Reinehr T, Hinney A, Friedel S, Müller T.D, Hebebrand J. Einfluss genetischer Marker auf den Erfolg einer Lifestyle Intervention. *Aktuel Ernähr Med* 2008;**33**:1-6.

Roth C.L, Hinney A, Reinehr T, Schreiner F, Nguyen T.T, Müller T.D, Scholl C, Woelfle J, Karpushova A, Schäfer H, Nöthen MM, Hebebrand J. *TCF7L2* Polymorphism *rs7903146* and Predisposition for Type 2 Diabetes Mellitus in Obese Children. *Horm Metab Res* 2008 Jun 10. [*Epub ahead of print*]

Vogel C.I.G, Greene B, Scherag A, Müller T.D, Friedel S, Grallert H, Illig T, Wichmann H-E, Hebebrand J and Hinney A. Brief report: Non-replication of an association of *CTNNB1* polymorphisms and obesity. *J Clin Endocrinol Metab. In Submission*.

Posterbeiträge national

Müller T.D, Reichwald K, Wermter A-K, Brönner G, Nguyen T.T, Friedel S, Koberwitz K, Engeli S, Lichtner P, Meitinger T, Schäfer H, Hebebrand J, Hinney A, Keine Assoziation von genetischen Varianten im Cannabinoidrezeptor 1 Gen (*CNR1*) mit frühmanifesten Adipositas bei deutschen Kindern und Jugendlichen; 23. Jahrestagung der Deutschen Adipositasgesellschaft, Berlin, 18-20 Oktober 2007.

Müller T.D, Hinney A, Scherag A, Nguyen T.T, Schreiner F, Hebebrand J, Roth C.L, Reinehr T. Fat mass and obesity associated gene (*FTO*): lack of association with weight loss and lipid metabolism markers. Symposium am deutschen Institut für Ernährungsforschung, Dife; Genetics and Pathophysiology of Type 2 Diabetes, Potsdam-Rehbrücke, 14-15 Februar 2008.

Posterbeiträge international

Müller T.D, Reichwald K, Wermter A-K, Brönner G, Nguyen T.T, Friedel S, Koberwitz K, Engeli S, Lichtner P, Meitinger T, Schäfer H, Hebebrand J, Hinney A. No evidence for an involvement of variants in the cannabinoid receptor gene (*CNR1*) in obesity in German children and adolescents. Erasmus Intensive Programme Combating Obesity: Strategies for Prevention and Intervention 'Cospi'; February 3-17, 2007; Graz, Austria.

9. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Johannes Hebebrand, Direktor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Universität Duisburg-Essen, für die Möglichkeit, die Promotion an seiner Klinik durchzuführen sowie für die Überlassung dieses interessanten Themas. Weiterhin danke ich ihm für die hervorragende fachliche Betreuung meiner Arbeit und für die konstruktiven Freitagsgespräche.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Anke Hinney, Leiterin des molekulargenetischen Forschungslabors der o. g. Klinik, für die exzellente Betreuung während meiner Arbeit sowie für die konstitutive Hilfe bei aufkommenden Fragen im Labor und bei der Erstellung der Publikationen. Weiterhin bedanke ich mich bei Susann Friedel, Dr. Carla Vogel, Dr. Günter Brönner und Dr. Kathrin Reichwald für die schönen drei Jahre im Labor, in denen sie mich mit viel Rat und Tat unterstützt haben. Außerdem danke ich Jitka Andrä, Beate Kirschbaum, Siglinde Düerkop und Gisela Müller für die Hilfe im Labor und für die konstitutive Inhibition einer Hypoglykämie aufgrund permanenter Verpflegung mit Kaffee und Kuchen. Ein weiterer Dank gilt Dr. André Scherag sowie Thuy Trang Nguyen für die statistische Auswertungen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Prof. Dr. Thue Schwartz danke ich für die funktionelle Analyse der *CNR1* Ala419Glu Variante. Außerdem bedanke ich mich bei PD Dr. Thomas Illig und Prof. Dr. Thomas Meitinger für die Hochdurchsatz-Genotypisierungen mittels MALDI-TOF. Bei PD Dr. Thomas Reinehr und Prof. Christian L. Roth möchte ich mich für die Rekrutierung der Probanden sowie für die Bereitstellung der analysierten Blutparameter bedanken.

Ich bedanke mich bei meiner Freundin Annett, für den liebevollen Druck, meine Arbeit schnellstmöglich abzuschließen.

Zum Schluss gilt ein besonderer Dank meinen Eltern, die mich immer in meinem Entschluss, Biologe zu werden, unterstützt haben.

10. Lebenslauf

Name Timo Dirk Müller

Anschrift Berliner Strasse 26
35713, Eschenburg-Eibelshausen
Tel: 02774 / 71110
E-Mail: timo.mueller@uni-due.de

Geburtsdatum und Ort 26.07.1977 in Herborn

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand ledig, keine Kinder

Schulische Ausbildung

1984 – 1988	Grundschule Eibelshausen
1988 – 1990	Förderstufe der Holderbergschule Eibelshausen
1990 – 1993	Gymnasium der Holderbergschule Eibelshausen
1993 – 1997	Gymnasium der Wilhelm-von-Oranien-Schule Dillenburg

Zivildienst

08.1997 – 09.1998 Lebenshilfe Dillenburg e.V.

Studium

10.1998 – 05.2005 Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie
Abschluss: Diplom mit Gesamtnote: 1,1

Promotion

06.2005 – Universität Duisburg-Essen, Rheinische Kliniken Essen,
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und
Jugendalters, molekulargenetisches Forschungslabor

Essen, den _____

11. Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Molekulargenetische Studien zu verschiedenen Kandidatengenen für frühmanifeste (extreme) Adipositas“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Timo Dirk Müller befürworte.

Essen, den _____

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine andere Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____